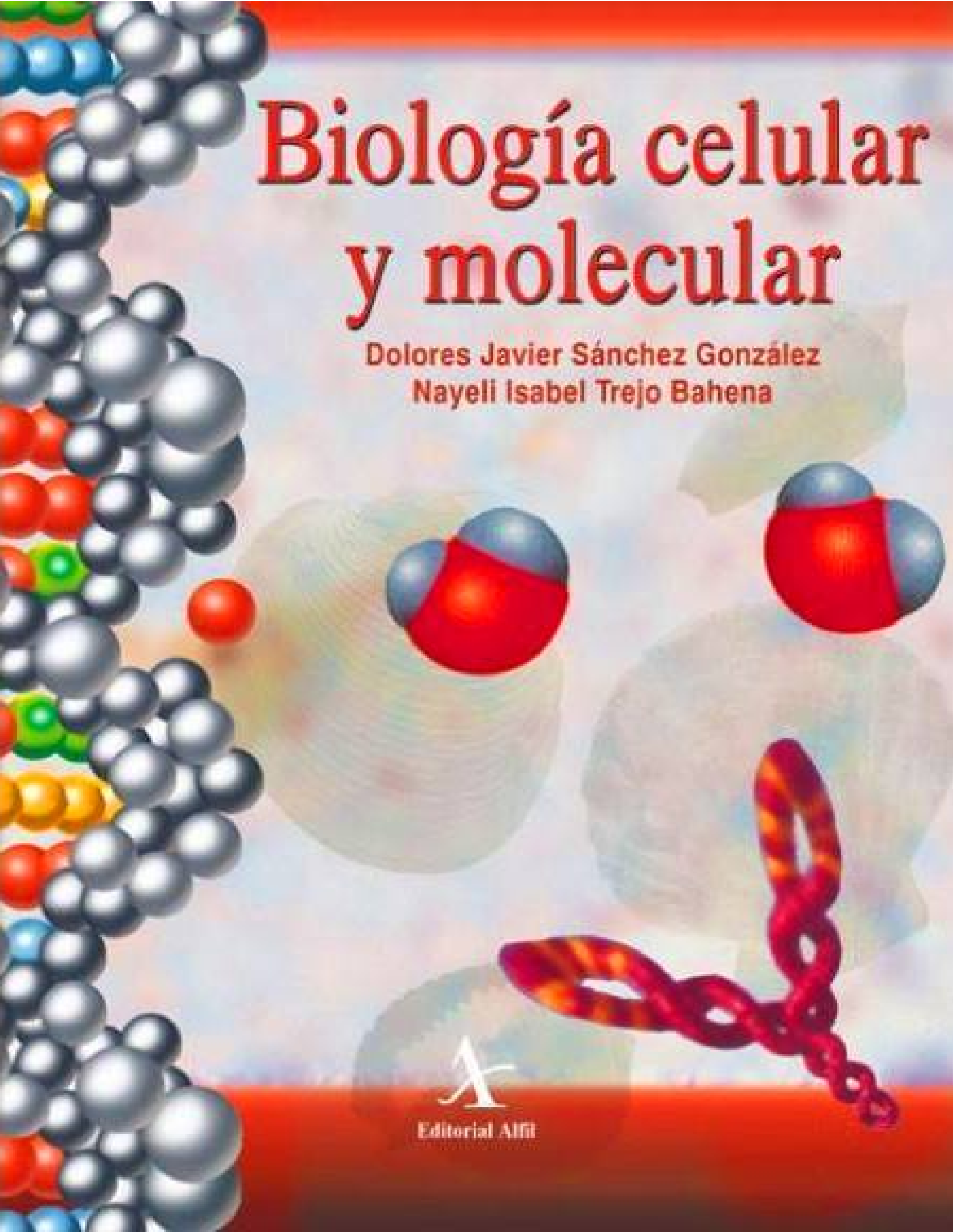
Biología celular y molecular

Dolores Javier Sánchez González
Nayeli Isabel Trejo Bahena



Editorial Alfil

BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

www.elsolucionario.org

www.elsolucionario.org

Biología celular y molecular

Dr. Dolores Javier Sánchez González

Jefe del Departamento de Biología Celular y Tisular;
Profesor Titular de Biología Celular y Tisular;
Profesor Titular de Metodología de la Investigación, Escuela Médico Militar,
Universidad del Ejército y Fuerza Aérea.
Profesor Titular de Histología, Escuela Militar de Graduados de Sanidad,
Universidad del Ejército y Fuerza Aérea.
Sección de Posgrado e Investigación, Escuela Superior de Medicina
del Instituto Politécnico Nacional.
Miembro del Sistema Nacional de Investigadores, CONACYT.

Dra. Nayeli Isabel Trejo Bahena

Sección de Medicina Legal, Hospital Central Militar.
Escuela Militar de Graduados de Sanidad,
Universidad del Ejército y Fuerza Aérea.

TU MEJOR CAMINO AL ÉXITO
UNIPUEBLA
www. unipuebla.com
www.unipuebla.com.mx

Editorial Alfil

www.elsolucionario.org

Biología celular y molecular
Todos los derechos reservados por:
© 2006 Editorial Alfil, S. A. de C. V.
Insurgentes Centro 51-204, Col. San Rafael
06470 México, D. F.
Tels. 55 66 96 76 / 57 05 48 45 / 55 46 93 57
e-mail: alfil@editalfil.com
www.editalfil.com

ISBN 968-7620-34-X

Primera edición, 2006

Dirección editorial:
José Paiz Tejada

Editor:
Dr. Jorge Aldrete Velasco

Diseño de portada:
Arturo Delgado-Carlos Castell

Dibujos:
Alejandro Rentería

Impreso por:
Digital Oriente, S. A. de C. V.
Calle 15 Mz. 12 Lote 17,
Col. José López Portillo
09920 México, D. F.
Septiembre de 2006

www.elsolucionario.org

Autores y colaboradores

AUTORES

Dr. Dolores Javier Sánchez González
Jefe del Departamento de Biología Celular y Tisular; Profesor Titular de Biología Celular y Tisular; Profesor Titular de Metodología de la Investigación, Escuela Médico Militar, Universidad del Ejército y Fuerza Aérea. Profesor Titular de Histología, Escuela Militar de Graduados de Sanidad, Universidad del Ejército y Fuerza Aérea. Sección de Posgrado e Investigación, Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional. Miembro del Sistema Nacional de Investigadores, CONACYT.
Capítulos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10

Dra. Nayeli Isabel Trejo Bahena
Sección de Medicina Legal, Hospital Central Militar. Escuela Militar de Graduados de Sanidad, Universidad del Ejército y Fuerza Aérea.
Capítulos 2, 4, 5, 6, 8

COAUTORES

Dr. Ismael Vásquez Moctezuma
Laboratorio de Biología Molecular, Instituto Mexicano de Oncología, Universidad de Puebla, UNIPUEBLA. Sección de Posgrado e Investigación, Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional
Capítulos 1, 5, 8, 10

M. en C. Dairo Jesús Orjuela Henry
Profesor Titular de Biología Molecular y Genética. Profesor Titular de Bioquímica. Profesor Asociado de Biología Celular y Tisular. Profesor Titular de Metodología de la Investigación, Escuela Médico Militar, Universidad del Ejército y Fuerza Aérea. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.
Capítulos 3, 6, 7, 10

Dr. Luis Humberto Pérez Astudillo
Profesor Titular de Biología Celular y Tisular, Escuela Médico Militar, Universidad del Ejército y Fuerza Aérea. Jefe del Laboratorio de Análisis Clínicos BIOTEST, Ciudad Sahagún, Hidalgo, México.
Capítulos 6, 7, 9, 10

Quim. Clin. Claudia María Martínez Martínez
Profesor Titular de Biología Celular y Tisular, Escuela Médico Militar, Universidad del Ejército y Fuerza Aérea. Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México.
Capítulo 4

Dr. Esaú Floriano Sánchez
Jefe del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Profesor Titular de Biología Molecular y Genética. Profesor Titular de Bioquímica. Profesor Titular de Metodología de la Investigación, Escuela Médico Militar, Universidad del Ejército y Fuerza Aérea.
Capítulo 4

www.elsolucionario.org

M. en C. Yolanda Irasema Chirino López
Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.
Capítulo 1

M. en C. G. Yazmín Arellano Salazar
Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.
Capítulo 3

COLABORADORES

Las siguientes personas colaboraron en la preparación de muestras de células y tejidos, en la revisión de los contenidos y en la toma de algunas de las fotografías presentadas en esta obra.

Dr. Juan Ambrosio Ortega Rangel
Profesor Titular de Biología Celular y Tisular, Escuela Médico Militar, Universidad del Ejército y Fuerza Aérea. Laboratorio de Microscopia Confocal, Instituto Nacional de la Comunicación Humana.

Técnico Histopatólogo Lucas Salazar Acevedo
Departamento de Biología Celular y Tisular, Escuela Médico Militar, Universidad del Ejército y Fuerza Aérea. Departamento de Patología del Hospital Ángeles Interlomas. Departamento de Patología del Hospital ABC.

Q. F. B. Andrés Balderas Cornelio
Departamento de Biología Celular y Tisular, Escuela Médico Militar, Universidad del Ejército y Fuerza Aérea.

Q. F. B. Fabiola Salinas Cano
Laboratorio Científico de Investigaciones, Procuraduría General de Justicia Militar.

Quím. Clín. Gilberto Francisco Uscanga Tejeda
Laboratorio Científico de Investigaciones, Procuraduría General de Justicia Militar.

M. en C. Gema Martínez Cabrera
Laboratorio de Neuromorfología, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México.

Q. F. B. Arturo Hernández Mendoza
Químico Farmacéutico Biólogo, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. Investigador del Instituto Nacional de Pediatría. Jefe de Planes y Programas, Sección Pedagógica, Escuela Médico Militar, Universidad del Ejército y Fuerza Aérea.

Biol. Juan Carlos León Contreras
Departamento de Patología, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”.

www.elsolucionario.org

Contenido

Introducción ..... **XI**

Prólogo ..... **XIII**

Capítulo 1. Generalidades de biología celular **1**

Dolores Javier Sánchez González, Yolanda Irasema Chirino López, Ismael Vásquez Moctezuma

Introducción 1
Fisiología celular 3
Metabolismo 4
Homeostasis 6
Bases químicas de la vida 6
Agua 9
Equilibrio ácido-base 11
Trastornos del equilibrio ácido-base 12
Moléculas orgánicas 13
Renovación celular 28

Capítulo 2. Evolución y diversidad de los seres vivos **29**

Dolores Javier Sánchez González, Nayeli Isabel Trejo Bahena

Evolución 29
Niveles de organización en biología 34
Diversidad de los seres vivos 40

Capítulo 3. Citoplasma **49**

Dolores Javier Sánchez González, Dairo Jesús Orjuela Henry, G. Yazmín Arellano Salazar

Introducción 49
Membrana celular o plasmalema 49
Reconocimiento celular 57
Retículo endoplasmático 61
Ribosomas 71
Aparato de Golgi o dictiosoma 77
Vacuolas 80
Cuerpos multivesiculares 80
Lisosomas 80
Peroxisomas 81
Proteasomas 81
Mitocondrias 82

www.elsolucionario.org

Laminillas anilladas ... 88
Citoesqueleto ... 88
Organelos no membranosos ... 93
Inclusiones citoplasmáticas ... 95

Capítulo 4. Núcleo celular. Estructura y expresión génica ... 99
Dolores Javier Sánchez González, Nayeli Isabel Trejo Bahena, Claudia Marta Martínez Martínez, Esaú Floriano Sánchez
Introducción ... 99
Envoltura nuclear o nucleolema ... 101
Poros nucleares ... 101
Nucleolo ... 102
Cromatina ... 104
Empaquetamiento del DNA ... 106
Cromosomas ... 108
Replicación (duplicación) del DNA ... 110
Transcripción de genes ... 112
RNA autocatalíticos o ribozimas ... 116
Retrotranscripción ... 117

Capítulo 5. Genoma humano y herencia ... 119
Dolores Javier Sánchez González, Ismael Vásquez Moctezuma, Nayeli Isabel Trejo Bahena
Introducción ... 119
Genoma ... 120
Bases moleculares de la herencia ... 121
Genes ... 125
Mapeo génico ... 126
Herencia humana ... 126
DNA no codificante o extragénico ... 129
Polimorfismo de un nucleótido ... 131
Genoma mitocondrial ... 131
Mutaciones ... 132
Reparación del DNA ... 133
Cariotipo ... 134
Anomalías cromosómicas ... 134
Enfermedades genéticas ... 135
Ejemplos de trastornos de un solo gen ... 136
Trastornos cromosómicos ... 138
Trastornos multifactoriales ... 138

Capítulo 6. Nacimiento celular. Ciclo celular ... 139
Dolores Javier Sánchez González, Dairo Jesús Orjuela Henry, Luis Humberto Pérez Astudillo, Nayeli Isabel Trejo Bahena
Introducción ... 139
División celular en procariotas ... 140
División celular en eucariotas ... 141
Interfase ... 141
Mitosis ... 142
Meiosis ... 145
Control del ciclo celular ... 148
Ciclinas ... 150
Cinasas dependientes de ciclina ... 152
Transducción de señales y ciclo celular ... 154

Capítulo 7. Muerte celular. Apoptosis ... 157
Dolores Javier Sánchez González, Dairo Jesús Orjuela Henry, Luis Humberto Pérez Astudillo

www.elsolucionario.org

Introducción 157
Características morfológicas 158
Fases 159
Necrosis y apoptosis 160
TUNEL 160
Relación de la apoptosis con el ciclo celular 160
Histofisiología de la apoptosis 162
Familias de moléculas relacionadas con la apoptosis 162
Regulación molecular de la apoptosis 170
Cambios en la membrana plasmática 174
Cambios nucleares 176
Eliminación de la célula apoptósica 176
Apoptosis y enfermedad 177

Capítulo 8. Biología molecular del cáncer 179
Dolores Javier Sánchez González, Ismael Vásquez Moctezuma, Nayeli Isabel Trejo Bahena
Introducción 179
Oncogenes virales y oncogenes celulares 179
Agentes mutagénicos 180
El cáncer y la herencia 180
Oncogenes y genes supresores de tumores 180
Alteraciones epigenéticas relacionadas con el cáncer 181
Genes clave en la génesis del cáncer (oncogenes) 184
Genes supresores (antioncogenes) 186
Marcadores tumorales 188
Control del ciclo celular y terapia contra el cáncer 189

Capítulo 9. Microscopia 193
Dolores Javier Sánchez González, Luis Humberto Pérez Astudillo
Introducción 193
Historia de la histología y del microscopio 193
Microscopio de campo claro 194
Tipos de microscopios 196
Manejo del microscopio óptico 201
Ajuste de la iluminación Köhler 202
Ajuste para micrometría 203
Ajuste para contraste de fases 204
Limpieza del microscopio 204

Capítulo 10. Microscopia y técnicas complementarias 205
Dolores Javier Sánchez González, Dairo Jesús Orjuela Henry, Luis Humberto Pérez Astudillo, Ismael Vásquez Moctezuma
Métodos histológicos 205
Tipos de colorantes 212
Técnicas comunes de tinción en histología 214
Examen citológico 217
Técnicas especiales de tinción (argénticas) 218
Inmunolocalización para proteínas 219
Detección de ácidos nucleicos por microscopia 223
Técnicas de microscopia electrónica 226
Fraccionamiento celular 230
Autorradiografía y radioisótopos 232
Aislamiento y crecimiento de células en cultivo 233

Referencias 235

Índice alfabético 239

www.elsolucionario.org

www.elsolucionario.org

Introducción

Dolores Javier Sánchez González

El estudio de la medicina está sufriendo profundas transformaciones en la actualidad, ya que se está retomando la importancia del estudio de las materias básicas tradicionales como pilar fundamental en la integración básico-clínica de la práctica médica y en su relación con la investigación biomédica, al incorporar de manera continua los avances científicos en el estudio de genes (genoma), proteínas (proteoma) y biomoléculas de la biología molecular; el estudio de las células (biología celular); tejidos (histología); biología del desarrollo (embriología); en la función (fisiología); en el descubrimiento de nuevas estrategias terapéuticas contra enfermedades (farmacología) y contra defectos congénitos (terapia génica), así como la interrelación del ser humano con organismos patógenos (microbiología y parasitología).

En un futuro próximo se integrarán al estudio de la biomedicina y de la práctica profesional del médico disciplinas que cambiarán para siempre el rumbo de la medicina como hoy la percibimos: la farmacogenética y la farmacogenómica, en la generación de medicamentos más efectivos y menos tóxicos con base en la estructura genómica de cada población; estas nuevas estrategias terapéuticas, a su vez, forman parte de una nueva tendencia en el estudio de la medicina: la medicina genómica, la cual consiste en identificar las variaciones en el genoma humano que confieren riesgo de padecer enfermedades comunes, dando lugar a una práctica médica más individualizada, más preventiva y más predictiva, ya que permitirá identificar a los individuos con riesgo de desarrollar enfermedades comunes antes de que aparezcan los síntomas y así evitar o retrasar sus manifestaciones, complicaciones y secuelas.

La biología celular integra la estructura, biología molecular y fisiología a nivel celular; por esta razón también se le denomina biología celular y molecular, mientras que la citología se refiere sólo a la estructura de las células. La biología celular y tisular es el estudio de la biología celular y la histología integradas como un todo, ya que los tejidos están formados por células.

La investigación histológica (biología tisular) se ha desarrollado de manera explosiva en años recientes, ya que al incorporar a la biología molecular, inmunología y microscopia en todas sus modalidades: electrónica, confocal, multifotónica, etc., ha permitido el desarrollo de técnicas de investigación poderosas, como la hibridación *in situ* fluorescente (FISH) para el estudio de los ácidos nucleicos DNA y RNA en células y tejidos (biología molecular aplicada a la histología) y la inmunohistoquímica e inmunofluorescencia (inmunología aplicada a tejidos).

www.elsolucionario.org

www.elsolucionario.org

Prólogo

Dolores Javier Sánchez González

El conocimiento actual de la estructura y función de los seres vivos tiene su fundamento en los métodos necesarios para la investigación en las células y tejidos. Los descubrimientos recientes sobre las células son consecuencia directa del desarrollo de técnicas de investigación novedosas, como la microscopia confocal láser, el fraccionamiento celular, la inmunohistoquímica, la cinética de enzimas y la biotecnología de los ácidos nucleicos (DNA y RNA), entre otros. Se requiere tener ciertos conocimientos respecto a los principios fundamentales de los métodos utilizados actualmente en la investigación biomédica para que el estudio de la biología celular y molecular no sea un aprendizaje estéril, sino que además permita adoptar una postura crítica frente a los fenómenos que ocurren en las células y tejidos. Por esta razón, en este libro se incluye una sección de microscopia dedicada a estas nuevas metodologías que nos permiten sumergirnos hasta el interior de las tejidos, células y estructuras subcelulares para explorar, entender y en su caso descubrir los fenómenos bioquímicos y fisiológicos que regulan el nacimiento, el desarrollo y la muerte celular en un concierto complejo de billones de células que trabajan juntas en armonía de manera sincrónica en los organismos pluricelulares, como el ser humano.

Esta obra está dirigida a estudiantes de medicina, veterinaria, biología, odontología, enfermería y ciencias de la salud en general; a técnicos de laboratorio de histopatología, de biología y bioquímica, así como al personal especializado en procedimientos de investigación biomédica básica.

www.elsolucionario.org

www.elsolucionario.org

Agradecimientos

A la Dra. Martha Patricia Fernández Guzmán, fundadora de la Maestría de Morfología en el Ejército Mexicano. Por su incansable labor en la Escuela Médico Militar, ejemplo a seguir para las generaciones venideras. Por su participación directa en mi formación cómo morfólogo.

Al Dr. Jaime Berumen Campos, ex-investigador del Ejército Mexicano y actual investigador del Hospital General de México y de la Universidad Nacional Autónoma de México, verdadero ejemplo a seguir en el campo de la investigación en medicina, por su férrea y tenaz búsqueda en la generación del conocimiento.

Al Dr. Rogelio Enrique Hernández Pando, por su incansable labor como investigador del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán" y por su apoyo total y desinteresado para la realización de proyectos de investigación.

Al Dr. Ramón Arturo Valdés Espinosa, quien fue mi guía en la metamorfosis del campo clínico hacia el campo de la investigación experimental y me alentó hacia la búsqueda del conocimiento con mentalidad crítica y objetiva.

A mis profesores de histología: Alberto Alejandro Mercado Coria y Juan Ambrosio Ortega Rangel, quienes me enseñaron la materia en la carrera de medicina, así como en el posgrado y, con su esfuerzo y experiencia a lo largo de los años, han contribuido a la formación médica de incontables generaciones en la Escuela Médico Militar y en la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Dedico esta obra a tres grandes patólogos que me precedieron en el Laboratorio de Histología de la Escuela Médico Militar: Luis Benítez Bribiesca, Mario Ayala Zavala y Arturo Vargas Solano, porque justo es que se reconozca la obra de los que nos han precedido, sobre todo si su labor ha dejado huella imborrable en nuestras mentes y en nuestros corazones y porque ellos han trascendido hacia la generación del conocimiento.

A la Fundación Gonzalo Río Arronte, IAP, por la donación del microscopio confocal a la Escuela Médico Militar, de donde se obtuvieron todas las fotografías histológicas mostradas en esta obra.

A José Paiz Tejada, Director General de Editorial Alfil, S. A. de C. V., por su apoyo en la redacción y revisión de esta obra. Por sus valiosos comentarios, sugerencias y arreglos en los esquemas y figuras que enriquecen al libro.

Dolores Javier Sánchez González

www.elsolucionario.org

www.elsolucionario.org

Dedico esta obra a nuestros alumnos, a los que nos debemos y razón por la cual existen las Escuelas, Facultades y Universidades, quienes continuarán con nuestra labor, superándonos y demostrándonos que el conocimiento de nuestro entorno es cada vez más complejo y maravilloso a medida que pasa el tiempo. Espero alcanzar a ver la nueva gran revolución que se avecina en la práctica médica y que hasta ahora parece ser propiedad sólo de la comunidad científica: la era genómica.

A mis maestros en general: por su fructífero trabajo y por su participación directa en mi formación. Sembraron y comimos, sembremos para que coman.

Al Coronel Pagador Retirado Rafael Corona Vargas y al Dr. Ismael Vásquez Moctezuma, quienes me alentaron hacia la escritura de mi primer libro.

A mi familia y a mi esposa Nayeli, coautora principal de este libro. Por su apoyo, amor ilimitados y ayuda mutua en el difícil y eterno camino hacia la superación.

Dolores Javier Sánchez González

La mente humana es tan extensa, profunda y misteriosa como el universo mismo. Nosotros somos nuestros propios astronautas.

Dolores Javier Sánchez González

Saber no es suficiente, debemos aplicar. Desear no es suficiente, debemos actuar.

Goethe

www.elsolucionario.org

www.elsolucionario.org

Capítulo 1

Generalidades de biología celular

Dolores Javier Sánchez González, Yolanda Irasema Chirino López, Ismael Vásquez Moctezuma

INTRODUCCIÓN

El protoplasma es la sustancia fundamental de los seres vivos, como componente viviente de la célula; está compuesto principalmente por núcleo y citoplasma. La unidad mínima de protoplasma capaz de realizar las funciones de nutrición, relación y reproducción de manera independiente es la célula. Los seres vivos más simples, como los protozoos, se componen de una sola célula, mientras que los organismos superiores (multicelulares o metazoos) son complejos de muchas células diferentes especializadas en diferentes cosas. El núcleo está compuesto por nucleoplasma y nucleolema, o membrana nuclear, que lo separa del citoplasma. La célula está rodeada por una membrana celular o plasmalema. El núcleo y el citoplasma contienen organelos e inclusiones inmersas en la porción de citoplasma que se denomina citosol.

Las células son bioquímica, estructural y funcionalmente muy complejas; se clasifican en procariotas y eucariotas. Por lo general las células procariotas son más pequeñas y carecen de núcleo y de la complejidad interna de las células eucariotas; sin embargo, todas las células comparten características comunes, que son:

1. Características estructurales:
   - Membrana celular o plasmalema, que las separa y comunica con el exterior.
   - Pared celular que rodea a la membrana plasmática (sólo en bacterias y células vegetales).
   - Ribosomas.
   - Citoplasma, que forma la mayor parte del volumen celular y en el que están inmersos los organelos celulares.
   - Ácido desoxirribonucleico (DNA), es el material hereditario de los genes.
   - Ácido ribonucleico (RNA), expresa la información contenida en el DNA.
   - Biomoléculas, como enzimas y otras proteínas (producto de los genes), que ponen en funcionamiento la maquinaria celular; carbohidratos, lípidos, etc.
2. Características diferenciales y funcionales:
   - Autoalimentación o nutrición.
   - Autorreplicación o división celular.
   - Metabolismo.
   - Crecimiento.
   - Diferenciación.
   - Señalización química.
   - Evolución, etc.

La célula es la unidad funcional de todos los tejidos, mientras que los tejidos con características similares forman los órganos y éstos con funciones similares forman, a su vez, los aparatos o sistemas. Todos los organismos vivos están formados por células, de tal manera que ningún organismo es un ser vivo si no contiene al menos una célula. Algunos organismos microscópicos, como bacterias y protozoos, son células únicas (unicelulares), mientras que las plantas y los animales están formados por millones de células organizadas en tejidos y órganos. Aunque los extractos acelulares y virus realizan muchas de las funciones de las células vivas, carecen de vida independiente, capacidad de crecimiento y reproducción por sí mismos y, por tanto, no se les consi-

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

dera seres vivos. La biología estudia las células con base en su constitución molecular y la forma en que constituyen organismos muy complejos, como el ser humano. Para comprender cómo funciona, se desarrolla y envejece el cuerpo humano sano y qué falla en caso de enfermedad, es necesario conocer las células que lo integran.

Las células son de formas y tamaños muy variados. Algunas de las células bacterianas más pequeñas tienen forma cilíndrica de menos de 1 μm de longitud, mientras que las neuronas son de forma compleja, con numerosas prolongaciones delgadas que miden varios metros de longitud. La mayoría de las células vegetales miden de 20 a 30 μm de longitud, tienen forma poligonal y pared celular rígida. En promedio, las células del reino animal miden de 10 a 60 μm de diámetro; su membrana celular es flexible, con abundantes pliegues.

En el citoplasma se llevan a cabo numerosas reacciones químicas que permiten a las células realizar sus funciones fundamentales, como crecer, producir energía y eliminar residuos; estas acciones en conjunto se denominan metabolismo. Además, las células contienen la información genética heredable codificada en los genes localizados en grandes secuencias del DNA. La información genética dirige las funciones celulares y asegura la descendencia. Las numerosas similitudes entre las células de los diversos reinos de la vida demuestran que provienen de una célula ancestral común y que existe una relación evolutiva entre las células modernas y las primitivas. El término parénquima (del griego *para*, entre, *en,* en, y *chein,* verter) se aplica a los tejidos constituidos por células vivas que cumplen diferentes funciones. Las características distintivas de los seres vivos con respecto de los no vivos incluyen crecimiento, reproducción, herencia, adaptación al entorno, organización precisa, metabolismo, homeostasis (capacidad de mantener un medio interno apropiado a pesar de los cambios que tienen lugar en el medio externo), movimiento, respuesta a estímulos, evolución y muerte. En este capítulo viajaremos al interior de las células para explorar y entender los fenómenos bioquímicos y fisiológicos que regulan el desarrollo celular en los reinos de la vida.

La célula

Las células (del latín *cellulae*, celda) son estructuras muy organizadas, constituidas por organelos implicados cada uno de ellos en diferentes funciones. Los organelos son estructuras comunes a casi todas las células, se consideran como órganos internos metabólicamente activos y realizan funciones esenciales específicas. Las inclusiones son acúmulos inertes que contienen productos metabólicos o celulares. La célula es capaz de regular su metabolismo y de mantener en reserva un amplio repertorio de reacciones químicas reprimidas debido a la presencia predominante en el citoplasma de organelos limitados por membrana.

Al igual que los demás seres vivos, los seres humanos están formados por 250 distintos tipos de células con funciones específicas que en total suman casi 100 billones (10^{14}). Las células se pueden estudiar según su forma y su tamaño (figura 1-1).

Forma

Las neuronas contienen numerosas ramificaciones, mientras que las células musculares son alargadas y fusiformes. Se ha demostrado que la forma está condicionada por la función: en un medio líquido adquieren forma redondeada, en asas compactas con forma poliédrica, como en la sangre y en suspensión. Las amebas y los leucocitos pueden variar su forma a medida que se des-

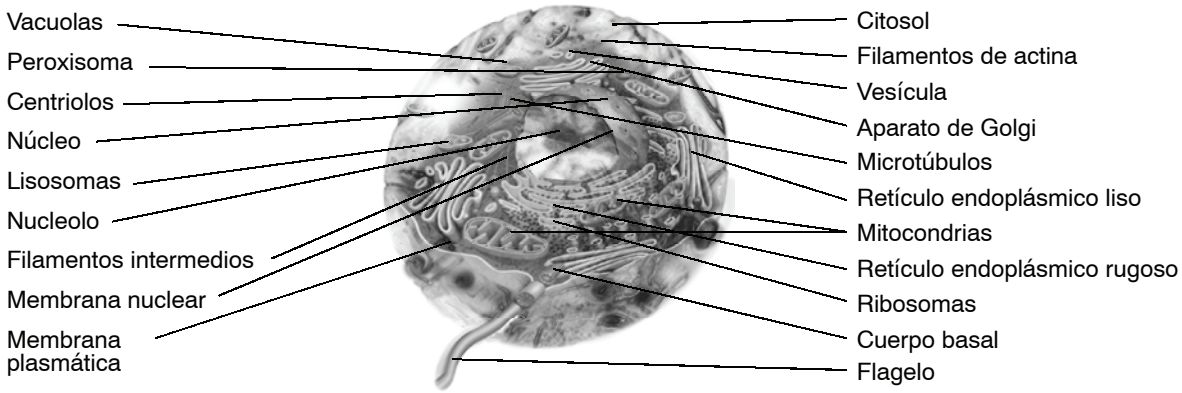


Figura 1-1. Esquema de una célula animal. Se muestran sus principales componentes: núcleo, citoplasma, membranas celular y nuclear y organelos.

www.elsolucionario.org

A

$1\ m = 10^3\ mm = 10^6\ \mu m = 10^9\ nm = 10^{10}\ Å$
$1\ mm = 10^3\ \mu m = 10^6\ nm = 10^7\ Å$
$10^{-3}\ mm = 1\ \mu m = 10^3\ nm = 10^4\ Å$
$10^{-6}\ mm = 10^{-3}\ \mu m = 1\ nm = 10\ Å$
$10^{-7}\ nm = 10^{-4}\ \mu m = 10^{-1}\ nm = 1\ Å$

B

Equivalencias de un metro

Órdenes de magnitud	Múltiplos	Submúltiplos
Primer orden de magnitud	10^{-1} decámetros	10^{1} decímetros
Segundo orden de magnitud	10^{-2} hectómetros	10^{2} centímetros
Tercer orden de magnitud	10^{-3} kilómetros	10^{3} milímetros
Cuarto orden de magnitud	10^{-4} miriámetros	10^{6} micrómetros
Quinto orden de magnitud	10^{-6} megámetros	10^{9} nanómetros
Sexto orden de magnitud	10^{-9} gigámetros	10^{10} ángstroms
Séptimo orden de magnitud	10^{-12} terámetros	10^{12} picómetros
Octavo orden de magnitud	10^{-15} petámetros	10^{15} fentómetros
Noveno orden de magnitud	10^{-18} exámetros	10^{18} attómetros
Décimo orden de magnitud	10^{-21} zettámetros	10^{21} zeptómetros
Undécimo orden de magnitud	10^{-24} yottámetros	10^{24} yoctómetros

Figura 1-2. ***A.*** Se muestran las unidades usuales de medición en biología y medicina, basadas en el sistema métrico decimal. Å: ángstrom; nm: nanómetro; μm: micrómetro. ***B.*** Múltiplos y submúltiplos del metro. El sistema métrico decimal agrupa unidades de medida basadas en el metro y relacionadas entre sí por múltiplos o submúltiplos de 10. El metro es la diezmillonésima parte de la distancia del polo norte al ecuador, o la distancia recorrida en el vacío por la luz durante un tiempo de 1/299 792 458 seg, casi 3 nanosegundos (ns). Se implantó en la Primera Conferencia General de Pesos y Medidas en 1889 en París, donde se fabricó un metro patrón de platino e iridio a 0 °C y una atmósfera de presión. Actualmente se le conoce como Sistema Internacional de Unidades (SI), el cual contiene siete unidades básicas, que son el metro (m) para la longitud, el segundo (s) para el tiempo, el kelvin (K) para la temperatura, el kilogramo (kg) para la masa, la candela (cd) para la intensidad luminosa, el amperio (A) para la intensidad de corriente eléctrica y el mol (mol) para la cantidad de sustancia.

plazan; las células epiteliales son casi rectangulares y se unen fuertemente a sus vecinas, mientras que los espermatozoides tienen un gran flagelo que les provee locomoción.

Tamaño

No existe relación entre el tamaño del animal y el tamaño de sus células; tampoco existe relación entre el tamaño celular y su función. Debido a que las células son pequeñas, las distancias que las moléculas recorren dentro de ellas son cortas; esto les permite acelerar sus procesos metabólicos. En biología se utiliza de manera habitual el sistema métrico decimal (SMD). Un nanómetro (nm) equivale a 0.000000001 m, o 0.000001 mm (figura 1-2).

FISIOLOGÍA CELULAR

Las células tienen propiedades fundamentales que no necesariamente son comunes a todas las células, como respiración, irritabilidad, conductibilidad, contractilidad, reproducción, absorción, secreción y excreción, etc. La absorción es la capacidad de las células de captar sustancias del entorno, las cuales pueden ser procesadas en el interior de la célula y posteriormente secretadas para desempeñar diversas funciones, o excretadas como productos de desecho. Las células degradan los alimentos consumidos en presencia de oxígeno (respiración celular).

La capacidad celular de responder a diversos estímulos se denomina irritabilidad. Si este estímulo es lo suficientemente fuerte, se puede transmitir (conductividad), como en el caso de los potenciales de acción entre las neuronas. Las células musculares, entre otras, también tienen la función de contractilidad ante diversos estímulos. Otras funciones celulares son:

Relación

Esta función permite la interacción de las células con el medio ambiente, y se basa en sus movimientos internos (ciclosis) o externos (tropismos y taxismos). La ciclosis es el movimiento cíclico que se genera en el citoplasma por acciones del citoesqueleto ante estímulos internos y externos. Los tropismos son movimientos de las células vegetales que orientan el crecimiento hacia o en contra de un estímulo externo, por ejemplo el fototropismo positivo en hojas y negativo en raíces (crecimiento diri-

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

gido por la luz solar). Los taxismos son movimientos que realizan las células animales para trasladarse de un lugar a otro mediante cilios, flagelos o por seudópodos (movimientos ameboidales) en respuesta a estímulos.

Sensibilidad

Las células reaccionan a estímulos físicos o químicos en su ambiente interno o externo. Los estímulos que producen reacciones en la mayoría de las células son los cambios en la temperatura, presión, vibraciones, luminosidad y cambios en la composición química del entorno, entre otros. Las plantas también reaccionan a la luz, la gravedad, la humedad, etc. La velocidad de flujo del citoplasma de las células vegetales se acelera o detiene por las variaciones en la intensidad de la luz.

Crecimiento

Se define como un aumento en la masa celular, como resultado de un incremento del tamaño de las células individuales (hipertrofia), del número de células (hiperplasia) o de las dos cosas. Cabe mencionar que la velocidad de crecimiento puede ser uniforme o diferente en las diversas partes de un organismo.

Reproducción

Es la propiedad de engendrar organismos similares asegurando la supervivencia de la especie. Todas las células provienen de una célula similar, excepto la célula primitiva que dio origen a la vida en la Tierra, que pudo originarse a partir de biomoléculas, energía y agua.

Puede ser asexual, como en los organismos unicelulares, o sexual, como en los organismos superiores. En los vegetales inferiores la reproducción puede ser asexual o sexual, con alternancia de generaciones sexuales y asexuales. En los mamíferos, la reproducción celular puede ser por mitosis (la célula madre origina dos células con igual número de cromosomas diploides) o por meiosis (la célula madre origina cuatro células con la mitad del número cromosómico o haploides).

Herencia

Todas las células poseen un sistema genético en la molécula de DNA, el cual forma los genes o unidades de material hereditario. Los monómeros de nucleótidos de DNA codifican la información que determina las características individuales de los organismos. El código genético es universal en todas las células, lo que también confirma la evolución a partir de una célula ancestral. Los genes transmiten la información de generación en generación, y también regulan el desarrollo y funcionamiento celular. El DNA transcribe su información al RNA. El RNA mensajero traduce ese mensaje para que se forme una determinada proteína.

Adaptación

La capacidad que tienen las células para adaptarse a su ambiente es la característica que les permite sobrevivir en un mundo en constante cambio. Estas adaptaciones son rasgos que incrementan la capacidad de sobrevivir en ambientes hostiles. Tales adaptaciones pueden ser estructurales, bioquímicas, genéticas, fisiológicas, conductuales o una combinación de ellas. La mayor parte de las adaptaciones se producen en periodos muy prolongados de tiempo, y en ellas intervienen varias generaciones; ésta es la base fundamental de la evolución.

Nutrición

Mediante este conjunto de funciones, las células obtienen nutrientes y energía por intercambio con el entorno. En los organismos autótrofos (fabrican su propio alimento) las funciones son fotosíntesis, respiración y circulación, mientras que en los heterótrofos (obtienen energía de otro organismo) son asimilación, ingestión, digestión, excreción, respiración y circulación.

La fotosíntesis es la conversión de energía luminosa (luz solar) en los enlaces carbono-carbono (C-C) de los carbohidratos; mediante este proceso, la mayoría de los autótrofos obtienen su energía.

La quimiosíntesis es la captura de energía liberada por ciertas reacciones químicas. Se cree que la quimiosíntesis apareció en la Tierra antes que la fotosíntesis.

METABOLISMO

La palabra metabolismo deriva del vocablo griego *metabolé,* que significa cambio, transformación. Mediante este concepto se engloba una serie de reacciones químicas esenciales para la nutrición, crecimiento y reparación de las células, así como para la conversión de la

www.elsolucionario.org

energía en formas utilizables (transducción) en los seres vivos. Las reacciones metabólicas ocurren de manera continua en las células, y cuando se interrumpen totalmente se produce la muerte. Ciertos nutrientes se usan como combustible en la respiración celular, donde la energía almacenada en la célula se utiliza para su propio uso. En la mayoría de los organismos la respiración celular también requiere oxígeno (O_2), mientras que se eliminan los desechos celulares, como el dióxido de carbono (CO_2). Las reacciones químicas se regulan por enzimas o catalizadores químicos.

El metabolismo tiene tres fases:

Absorción

En esta fase las sustancias químicas y la energía del medio ambiente (nutrientes) penetran en el protoplasma. La energía puede ingresar a la célula bajo la forma de energía radiante, como luz, electricidad, calor, etc. La absorción consiste en la penetración de moléculas a través de la membrana plasmática. Esto implica que las moléculas sólidas, líquidas o gaseosas que se absorben deben estar disueltas.

Transformación

En esta fase se incluyen todos los actos por los que el protoplasma transforma las moléculas y la energía absorbidas; se divide en cuatro etapas:

1. **Digestión.** Consiste en hacer solubles los nutrientes absorbidos para hacerlos reaccionar químicamente y transformarlos en moléculas útiles para la célula.
2. **Asimilación.** Consiste en incorporar al protoplasma los nutrientes absorbidos, incorporándolos como componentes propios.
3. **Desasimilación.** En este proceso, el protoplasma desintegra parte de sus componentes o de sus reservas para generar los compuestos y energía que intervienen en la asimilación.
4. **Secreción.** En esta fase el protoplasma produce compuestos que intervienen en las transformaciones.

Excreción

Es la fase de eliminación de las moléculas que no se incorporaron a las células; también se pueden dispersar como energía. La absorción, transformación y excreción pueden producir en los organismos un crecimiento de la materia y energía (anabolismo) o pueden producir pérdida de éstas (catabolismo). En el anabolismo, las reacciones químicas permiten transformar sustancias sencillas en otras complejas, lo que se traduce en almacenamiento de energía, producción de nuevos materiales celulares y crecimiento. Sin embargo, el desdoblamiento de sustancias complejas con liberación de energía se desarrolla en el catabolismo. La fermentación y respiración son procesos catabólicos.

1. **Fermentación.** Es un proceso de generación de energía en ausencia de O_2. Los productos finales del proceso son moléculas orgánicas pequeñas, como el etanol, lo que se aprovecha en la industria para producir bebidas alcohólicas.
2. **Respiración.** Es un proceso que requiere de O_2 para producir cantidades elevadas de energía mediante una oxidación completa, liberando CO_2 y H_2O. La respiración celular es un proceso catabólico que se caracteriza por una serie de reacciones químicas de oxidorreducción, por medio de las cuales la célula degrada moléculas de nutrientes y produce energía biológicamente útil en la molécula adenosín trifosfato, o ATP, que la almacena y transporta.

Metabolismo basal

La actividad de mantenimiento de energía incluye procesos como la síntesis de proteínas (es la actividad que más energía consume, de 30 a 40% de las necesidades), el transporte activo y la neurotransmisión (40%); la actividad cardiaca y la respiración consumen 10% de la energía generada. El cerebro consume 20% de la energía basal, al igual que la masa muscular, aunque en peso representan 2 y 40%, respectivamente. En general, se requiere de 1 kilocaloría (Kcal) por kilogramo de peso corporal por hora. Las actividades ligeras, como caminar, trabajo de oficina o doméstico habitual, consumen entre 2.5 y 5 Kcal/minuto; las actividades moderadas, como viajar en bicicleta, cavar, etc., consumen entre 5 y 7.5 Kcal/minuto; las actividades pesadas, como los deportes intensos o trabajos fuertes, como la minería, consumen entre 7.5 y 10 Kcal/minuto, y actividades muy pesadas, como carreras de velocidad, consumen más de 10 Kcal/minuto. Los nutrientes, como proteínas, carbohidratos y grasas, actúan como combustible productor de energía. El organismo obtiene las grasas de manera exógena mediante la alimentación y endógena por el metabolismo.

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

HOMEOSTASIS

Es la tendencia de los organismos a mantener un medio interno constante; los mecanismos que realizan esta función se llaman mecanismos homeostáticos (del griego *homos,* mismo o similar, y *stasis,* estar, fijar), y son la capacidad de mantener relativamente constante el medio interno. Los procesos metabólicos deben ser constantemente regulados para mantener un estado de equilibrio. Cuando ya se sintetizó una cantidad suficiente de un componente celular, es necesario reducir o detener su producción. Cuando disminuye la energía disponible en una célula es necesario activar el metabolismo para poner a disposición de la célula nueva energía. Estos mecanismos autorregulados de control son muy sensibles y eficientes. La regulación de la temperatura corporal (homeotermia) evita que ésta se salga de sus valores normales (de 36.5 a 37.2 °C en el ser humano). Cuando la temperatura se eleva, el hipotálamo envía señales nerviosas hacia las glándulas sudoríparas e incrementa la secreción de sudor, que al evaporarse humedece y enfría la piel, reduciendo la temperatura corporal. Además, el aumento del flujo sanguíneo en la piel origina que el calor se disipe por radiación.

Cuando la temperatura del cuerpo desciende por debajo de su nivel normal, los vasos sanguíneos de la piel se contraen, reduciendo la pérdida de calor a través de su superficie. Si la temperatura corporal desciende aún más, el cerebro envía impulsos nerviosos hasta los músculos, estimulando contracciones musculares rápidas, denominadas escalofríos, un proceso que genera calor.

BASES QUÍMICAS DE LA VIDA

Los seres vivos están compuestos por átomos y moléculas. Los elementos básicos están organizados de una manera muy específica para mantener el flujo de energía necesario para la vida. A pesar de la gran biodiversidad, la composición química y los procesos metabólicos de las células son similares. Además, los mismos principios físicos y químicos que rigen a los sistemas vivos se aplican a los sistemas abióticos. La química de los seres vivos se analiza en la bioquímica, ciencia que estudia los compuestos derivados del carbono, y se caracteriza por reacciones en solución acuosa con un intervalo de temperatura pequeño. Las principales macromoléculas orgánicas son las proteínas, formadas por cadenas lineales de aminoácidos; los ácidos nucleicos DNA y RNA, formados por bases nucleotídicas, y los polisacáridos, formados por subunidades de azúcares. Las propiedades de las células se determinan por las moléculas que las componen; las células contienen tanto moléculas orgánicas como inorgánicas.

Enlaces químicos

Un enlace químico es la fuerza que mantiene unidos a los átomos de las moléculas; los enlaces químicos se dividen en:

Uniones electrostáticas o iónicas

Se dan cuando un ion es atraído por otro ion con carga opuesta. Un ion se forma cuando un átomo libera electrones (catión) o capta electrones (anión), y la carga opuesta de los dos iones produce una atracción y un enlace. Las uniones electrostáticas son fuertes y necesitan 320 kilojoules (kJ) por mol para ser separados, aunque en presencia de agua sólo se requiere de 8 kJ/mol para romperlos (figura 1-3).

Enlaces covalentes

En este tipo de enlace los átomos comparten los electrones para completar la órbita electrónica, y cuando ésta se completa la molécula se estabiliza. Se requiere de 200 a 450 kJ/mol para romper estos enlaces. Si se comparte un par de electrones es un enlace simple, pero si se comparten dos pares es un enlace doble. El carbono puede formar cuatro enlaces covalentes, como se observa en la figura 1-4 en la molécula del metano.

Se produce polaridad cuando los electrones de un enlace covalente no se comparten de modo equivalente. Esto hace que un átomo adquiere una carga ligera positiva y el otro una negativa. Las moléculas con cargas relativas se denominan polares, mientras que las que no tienen cargas relativas son no polares. Los enlaces polares y los no polares le dan características especiales a las moléculas.

Enlaces o puentes de hidrógeno

Se producen cuando los átomos de H con positividad relativa son atraídos por átomos con relatividad negativa; estos enlaces no comparten los electrones y tampoco los intercambian. Estos enlaces son muy débiles y, por consecuencia, se pueden separar con facilidad, sólo se requieren de 8 a 20 kJ/mol para seraparlos (figura 1-5).

www.elsolucionario.org

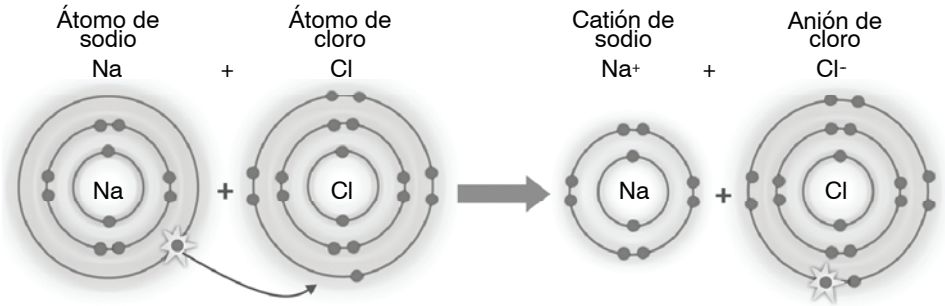


Figura 1-3. Esquema de la formación de un enlace iónico en el cloruro de sodio (sal de mesa). Un catión de sodio es atraído por un anión de cloro. La carga opuesta de los dos iones produce una atracción y un fuerte enlace que requiere de 320 kilojoules (kJ) por mol para ser separado, en ausencia de agua.

Fuerzas de van der Waals

Pueden ser de atracción o repulsión, y se presentan porque se crean desequilibrios cuando se comparten los electrones en un enlace covalente. Estas fuerzas acercan al máximo a las moléculas, pero manteniendo la distancia necesaria entre los átomos, es decir, las moléculas se ubican en un punto de equilibrio entre atracción y repulsión (como la Tierra y la Luna).

Esta atracción sólo requiere de 4 kJ/mol para romperse (figura 1-6).

Bioelementos

Casi 98% de la masa total de los seres vivos está formada por sólo seis elementos: hidrógeno (H), nitrógeno (N), oxígeno (O), carbono (C), calcio (Ca) y fósforo (P). Algunos investigadores han establecido al C, H, O, N como los bioelementos primarios o principales, ya que sólo estos cuatro elementos constituyen 95% de la masa total de los reinos de la vida. Quizá la explicación de su abundante presencia en las células se deba a sus propiedades fisicoquímicas, que los hacen idóneos para formar al protoplasma.

Estas propiedades son las siguientes:

1. Forman entre ellos enlaces covalentes, compartiendo electrones.
2. El C, el O y el N pueden compartir más de un par de electrones, formando enlaces dobles y triples, lo cual les confiere gran versatilidad para formar enlaces químicos.
3. El C, el H, el O y el N son los elementos más ligeros con capacidad de formar enlaces covalentes; esto ocasiona que las uniones entre ellos sean muy estables.

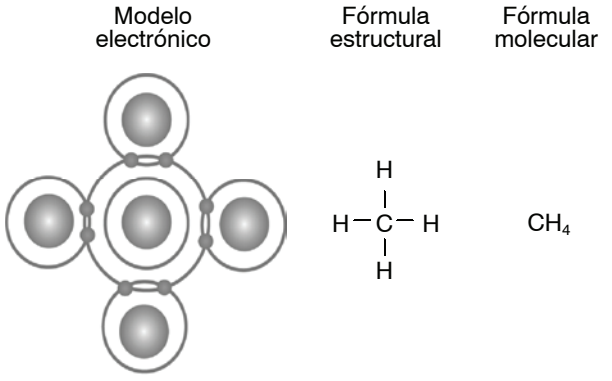


Figura 1-4. Esquema de la formación de enlaces covalentes simples en el metano entre el carbono y los hidrógenos donde comparten sólo un par de electrones.

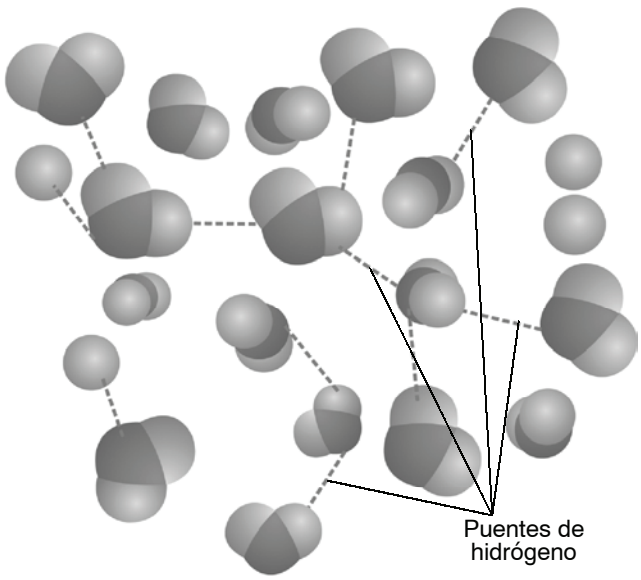


Figura 1-5. Esquema de la formación de puentes de hidrógeno en moléculas de agua. Son enlaces muy débiles donde los átomos de H^+ con positividad relativa son atraídos por átomos de O^- con relatividad negativa; estos enlaces no comparten los electrones y tampoco los intercambian.

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

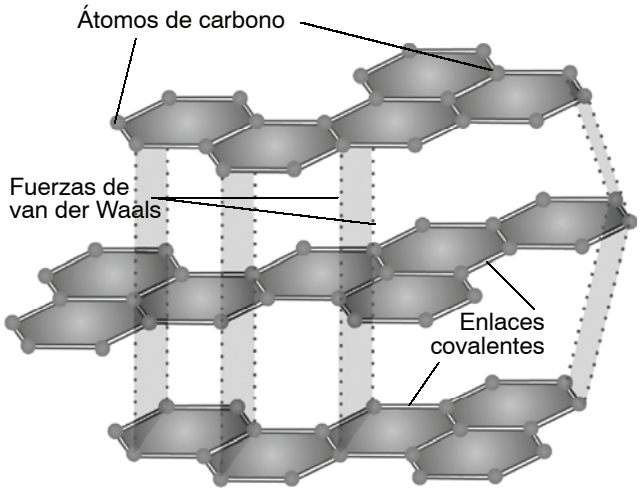


Figura 1-6. Esquema de las fuerzas de van der Waals que se establecen entre las biomoléculas. Los electrones se distribuyen de tal manera que las moléculas no polares se transforman en polares de manera temporal.

4. Debido a que los enlaces del carbono adoptan una configuración tetraédrica, las moléculas orgánicas tienen estructuras tridimensionales muy variadas (figura 1-7).
5. La conformación espacial de las moléculas orgánicas es responsable de la actividad biológica.

Otros 14 elementos más se presentan de manera constante en los seres vivos, pero en cantidades menores, por lo que habitualmente se denominan oligoelementos (*oligos,* reducido) o sales. En el cuadro 1-1 se muestran los elementos que se encuentran en el cuerpo humano.

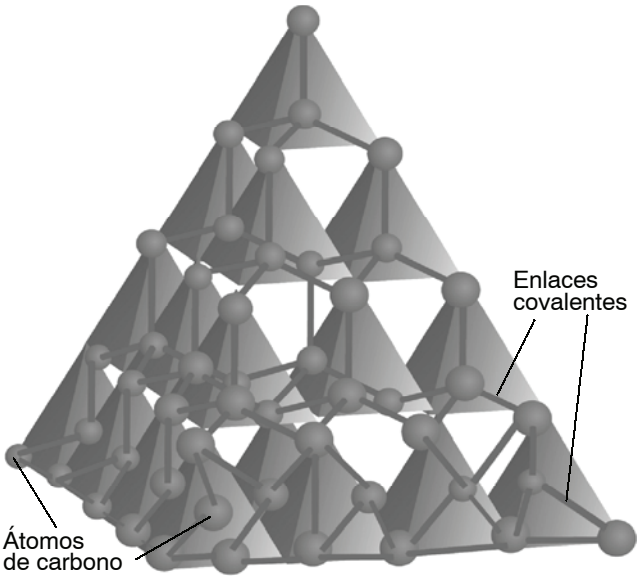


Figura 1-7. Esquema de la configuración tetraédrica que adoptan los enlaces del carbono en las moléculas orgánicas, lo que les proporciona gran versatilidad en su conformación tridimensional.

Oligoelementos o sales

Los iones de sales son importantes en el mantenimiento de la presión osmótica. El K^+ y el Mg^{++} se encuentran en el interior de la célula, y el Na^+, el Ca^{++} y el Cl^- fuera de ella. Las células y los líquidos extracelulares contienen una variedad de sales disueltas, entre las que se incluyen muchos iones esenciales para el equilibrio hídrico y ácido-básico. También participan en el funcionamiento neuromuscular, la coagulación sanguínea, la mineralización ósea, etc. Los líquidos corporales del ser humano se parecen al agua de mar en el tipo de sales presentes y en su abundancia relativa, aunque hay menos de 1% de sal disuelta (evidencia evolutiva de que la vida se originó en el mar). La concentración de los iones está determinada por las velocidades relativas de absorción y excreción por parte del organismo. Las concentraciones de los cationes y aniones respectivos permanecen constantes en condiciones normales (homeostasis), y cualquier cambio brusco ocasiona trastornos severos que pueden causar la muerte.

Electrólitos

Los compuestos químicos en solución pueden permanecer intactos o se pueden disociar. Las moléculas que se disocian en solución se degradan en partículas separadas o iones, y se conocen como electrólitos, los cuales regulan el equilibrio ácido-base. Cada una de las partículas disociadas de un electrólito contiene carga electrolítica positiva o negativa. Las moléculas que permanecen intactas en solución, como glucosa, creatinina y urea, no son electrólitos. Los cationes incluyen sodio (Na^+), potasio (K^+), calcio (Ca^{++}) y magnesio (Mg^{++}), mientras que los aniones son cloro (Cl^-), bicarbonato (HCO_3^-), fosfato (HPO_4^-) y sulfato (SO_4^-).

Los miliequivalentes (mEq) señalan el número de cargas iónicas o uniones electrovalentes en la solución ionizada de cada compartimiento corporal. Los niveles sanguíneos de electrólitos miden los electrólitos del compartimiento intravascular, pero no proporcionan un valor real de los electrólitos intracelulares.

Isótopos

Son los átomos del mismo elemento que contienen la misma cantidad de protones pero diferente número de neutrones, y que difieren en la masa atómica. Los tres isótopos del hidrógeno, ^1H (protio), ^2H (deuterio) y ^3H

www.elsolucionario.org

Cuadro 1-1. Elementos mayores y principales oligoelementos presentes en el cuerpo humano

Nombre	Masa%	Importancia o función
Bioelementos mayores del ser humano		
Oxígeno	65	Indispensable para la respiración celular; se encuentra en la mayoría de los compuestos orgánicos; junto con el hidrógeno, forma el agua
Carbono	18	Forma el esqueleto de todas las moléculas orgánicas; como tiene cuatro valencias, forma cuatro enlaces con átomos o moléculas
Hidrógeno	10	Junto con el oxígeno, forma parte del agua. Presente en la mayoría de los compuestos orgánicos
Nitrógeno	3	Se localiza en las proteínas, ácidos nucleicos y lípidos, entre otros
Calcio	1.5	Confiere la dureza y resistencia a los huesos y dientes; también interviene en la contracción muscular, sinapsis, señalización celular, etc.
Fósforo	1	Forma todos los nucleótidos y ácidos nucleicos; también se localiza en la matriz mineralizada de huesos y dientes; interviene en las cascadas de señalización celular e integra los fosfolípidos de las membranas
Principales oligoelementos (sales) del ser humano		
Potasio	0.4	Es el principal ion positivo (catión) del interior de las células; interviene en la integridad neural y muscular
Azufre	0.3	Se encuentra en la mayoría de las proteínas, donde forma enlaces o puentes disulfuro
Sodio	0.2	Principal catión del líquido intersticial; participa en el equilibrio hídrico del cuerpo e interviene en la generación del potencial de membrana y de acción en la conducción del impulso nervioso
Cloro	0.1	Es el principal ion negativo (anión) del líquido intersticial; participa también en el equilibrio hídrico del cuerpo
Magnesio	0.1	Esencial para casi todas las reacciones enzimáticas de importancia, también participa en el equilibrio hídrico del cuerpo
Yodo	Trazas	Se localiza en la glándula tiroides, donde se incorpora a las hormonas tiroideas
Hierro	Trazas	Se localiza en el grupo hemo de la hemoglobina y la mioglobina, así como de ciertas enzimas; participa en el transporte de O_2 y CO_2

(tritio) tienen cero, uno y dos neutrones, respectivamente, ya que el hidrógeno protio no contiene neutrones.

Todos los isótopos de un elemento contienen las mismas características químicas. Sin embargo, algunos isótopos con muchos neutrones son inestables y tienden a degradarse para formar un isótopo más estable (por lo general se convierten en otro elemento). Estos isótopos inestables se denominan radionúclidos o radioisótopos, porque liberan radiaciones de alta energía al desintegrarse.

Los radionúclidos como el tritio y el carbono 14 (^{14}C), cuyo isótopo normal es el carbono 12 (^{12}C), se emplean en medicina como herramientas de diagnóstico. Las reacciones de las moléculas orgánicas pueden ser detectadas en el cuerpo humano si se marcan con un radionúclido como el ^{14}C o el tritio. El ^{14}C se utiliza para establecer la edad de los registros fósiles (del latín *fossilis,* algo desenterrado). Debido a que la radiación emitida por los radionúclidos puede interferir con la división celular, algunos isótopos se utilizan en el tratamiento del cáncer.

Los radioisótopos se desintegran a velocidades características debido a su inestabilidad; dicha velocidad de desintegración se expresa como la vida media del radioisótopo (tiempo necesario para que se degrade en 50%).

Otros radioisótopos de importancia en biología son el azufre 35, el fósforo 32 y 33 y el yodo 125 y 131 (cuadro 1-2).

AGUA

Su fórmula química es H_2O (figura 1-8). Las reacciones químicas en los seres vivos se producen en un medio acuoso. El agua actúa como solvente de sustancias polares porque penetra en los iones, disminuyendo su atracción y separándolos; así, cada molécula de agua forma tres enlaces de hidrógeno. Los compuestos solubles en agua son hidrofílicos, mientras que las sustancias no solubles son hidrófobas.

Las necesidades normales de agua en el ser humano se calculan en unos 2.5 litros por día, la mitad para compensar las pérdidas por evaporación y la otra mitad es eliminada en la orina. Estas necesidades se elevan si aumentan las pérdidas por el sudor.

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

Cuadro 1-2. Isótopos de importancia en medicina y biología

Isótopo	Isótopo estable y % de frecuencia en la naturaleza	Vida media
^{3}H	^{1}H (99.99%)	12.26 años
^{35}S	^{32}S (95%)	86.7 días
^{125}I	^{127}I (100%)	57.4 días
^{131}I	^{127}I (100%)	8.05 días
^{32}P	^{31}P (100%)	14.3 días
^{33}P	^{31}P (100%)	25 días
^{19}O	^{16}O (99.76%)	29 s
^{15}N	^{14}N (99.63%)	7.35 s
^{14}C	^{12}C (98.89%)	5 760 años

Los alimentos aportan algo más de un litro, mientras que el agua metabólica (obtenida químicamente por el catabolismo de los otros componentes de los alimentos) representa 250 mL y el resto se toma directamente como bebida. La mezcla entre dos líquidos miscibles se denomina emulsión. La fuerza de atracción entre las moléculas de agua proporciona la capacidad de acumular calor. El agua también interviene como reactante en reacciones enzimáticas. Un aporte adecuado y continuo de agua es indispensable para la vida en todos los seres humanos.

Más de 70% del peso corporal del hombre adulto está constituido por agua. Los recién nacidos tienen una proporción mayor de agua, que corresponde a 78%.

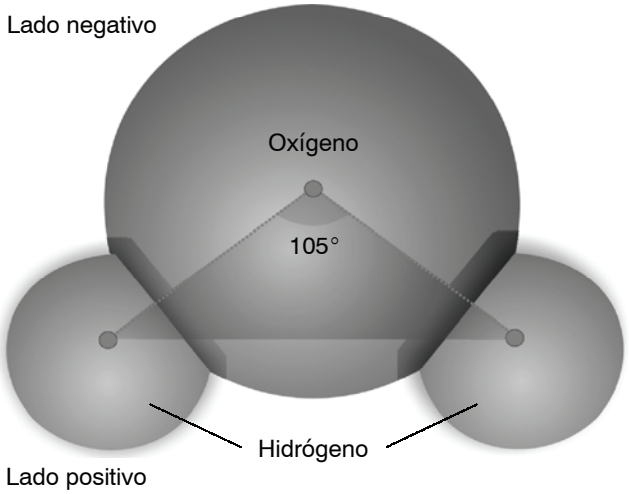


Figura 1-8. Esquema de la molécula de agua en modelo electrónico. Su fórmula química es H_2O, donde el oxígeno tiene carga parcialmente negativa y los hidrógenos carga parcialmente positiva, por lo que se pueden establecer puentes de hidrógeno entre las moléculas de agua.

Compartimientos líquidos

El agua corporal se mantiene en dos compartimientos mayores, el líquido intracelular (LIC) y el líquido extracelular (LEC). Estos compartimientos están separados por membranas semipermeables. El líquido intracelular representa de 30 a 40% del peso corporal. El compartimiento extracelular incluye el líquido intravascular o plasmático, el líquido intersticial y el líquido transcelular. El líquido intravascular o plasmático representa 5% del peso corporal total del ser humano. Si se produce deshidratación o hemorragia, el volumen plasmático se reduce y se presenta el estado de choque, pero si se produce sobrehidratación se produce edema en el tejido subcutáneo o pulmonar. El líquido intersticial está entre los espacios vasculares y las células; a diferencia del plasma, contiene muy pocas proteínas. Cerca de 25% del peso corporal del neonato es líquido intersticial, a los dos años de edad alcanza en el niño el nivel del adulto de 15% del peso corporal. El líquido transcelular incluye al líquido cefalorraquídeo (LCR), intraocular, pleural, peritoneal y sinovial, mientras que el líquido del tracto gastrointestinal, aunque transcelular, también se puede considerar extracorpóreo. Las colecciones de líquido patológicas de trasudado transcelular se denominan de acuerdo al sitio, como el derrame pleural de la cavidad pleural, el derrame pericárdico o hidropericardio del saco pericárdico y el líquido de ascitis en la cavidad peritoneal.

Regulación del agua corporal

El equilibrio hídrico en el cuerpo está controlado a través de la regulación del ingreso y excreción corporal. Por lo general el ingreso de agua es promovido por una sensación de sed. La sed se regula en el hipotálamo, y es una defensa contra la depleción de líquido y la hipertonicidad (aumento en la concentración de sales). La excreción del agua corporal se regula por la variación del ritmo del flujo urinario. Una disminución de la osmolaridad plasmática (normalmente de 285 a 295 mOsm/kg H_2O plasmática) indica un exceso de agua y produce un volumen aumentado de orina, con una osmolaridad menor a la plasmática para restablecer la osmolaridad plasmática normal. Cuando la osmolaridad plasmática se incrementa, el volumen urinario cae y su osmolaridad se eleva por encima de la del plasma. Esta regulación se realiza a través del eje neurohipofisorrenal. Además, el flujo urinario también se regula a través de la filtración glomerular, el epitelio tubular renal y las concentraciones plasmáticas de esteroides suprarrenales. La pérdida

www.elsolucionario.org

de agua corporal por medio de la evaporación en la piel está regulada por la frecuencia respiratoria, temperatura corporal ambiental y presión parcial de vapor de agua en el medio ambiente.

EQUILIBRIO ÁCIDO-BASE

Este equilibrio depende de la concentración de iones hidrógeno (H^+). Si la concentración de iones hidrógeno está elevada la solución se vuelve más ácida, pero si disminuye entonces se vuelve más alcalina. La cantidad de hidrógeno ionizado en solución se determina por el concepto de pH definido en 1909 por el danés Lauritz Sörensen. El pH es el logaritmo negativo de la concentración de iones H^+. Un pH menor de 7 se considera ácido, y superior de 7 se considera alcalino. Un pH de 7 corresponde a neutralidad. Una solución con un pH de 7 es neutra, ya que a esa concentración el número de iones hidrógeno está equilibrado por el número de iones hidroxilo presentes (figura 1-9).

El líquido extracelular es levemente alcalino, con un pH de 7.35 a 7.45. Si el pH se incrementa se produce un estado de alcalosis, pero si cae por debajo de lo normal, entonces se presenta un estado de acidosis. Cuando el pH del líquido corporal se eleva por encima de 7.7 o cae por debajo de 7 se pone en peligro la vida.

La regulación de la concentración del pH sanguíneo depende de tres mecanismos:

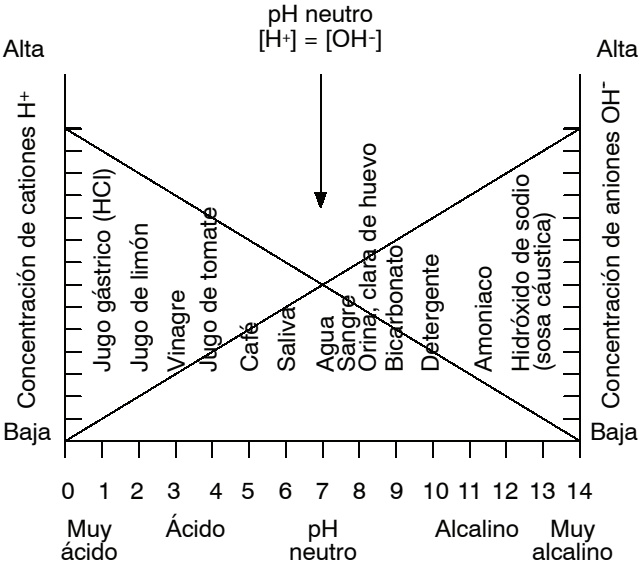


Figura 1-9. Esquema de la escala del pH.

1. Regulación respiratoria.
2. Sistemas amortiguadores (*buffer*).
3. Regulación renal del pH.

Regulación respiratoria

Si la profundidad y frecuencia respiratoria aumentan se pierde más CO_2, disminuyendo la concentración de ácido carbónico en la sangre; pero si la profundidad y frecuencia respiratoria disminuyen (respiración superficial) se extrae menos CO_2 y la concentración de ácido carbónico en la sangre aumenta, lo que conduce a un cambio en la relación de ácido carbónico con bicarbonato de sodio. Aunque los pulmones pueden modificar el pH cambiando la presión de dióxido de carbono (PCO_2), no existe ningún cambio en la cantidad de iones hidrógeno. Los pulmones no pueden regenerar bicarbonato para reemplazar lo que se ha perdido cuando los iones hidrógeno fueron amortiguados. La formación de nuevo bicarbonato y su excreción se lleva a cabo en los riñones.

Los sistemas *buffer*

Las soluciones *buffer* absorben el exceso de iones hidrógeno o los liberan, según los requerimientos. En el organismo existen tres sistemas *buffer*, de los cuales el sistema del bicarbonato es el más importante, porque regula las concentraciones relativas de ácido carbónico (H_2CO_3) y bicarbonato de sodio. Cuando los ácidos fuertes ingresan a la sangre, inmediatamente son amortiguados por la reacción con la sal de bicarbonato de sodio, y los cationes hidrógeno se eliminan para formar moléculas de ácido carbónico y una sal de sodio más el ácido amortiguado. El bicarbonato se encuentra en el líquido extracelular en una relación de una parte de ácido carbónico por 20 partes de bicarbonato base.

La concentración total de CO_2 del suero generalmente proporciona una estimación del nivel de bicarbonato. El valor normal durante el primer año de vida está entre 20 y 23 milimoles por litro (mmol/L), pero después del primer año de vida se establece entre 25 y 28 mmol/L.

Regulación renal del pH

El H_2CO_3 se forma en las células tubulares renales al combinarse el CO_2 con agua en el ciclo de Krebs bajo la influencia de la anhidrasa carbónica. Entonces un ion hidrógeno del ácido carbónico ingresa al filtrado y se intercambia por un ion de sodio. Después, el catión hidrógeno reemplaza al sodio en la molécula de fosfato y se excreta por la orina. El H_2CO_3 en el filtrado no se pierde

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

totalmente en la orina, ya que se disocia en CO_2 y agua. Entonces el CO_2 difunde hacia atrás a la célula tubular y regresa a los capilares como bicarbonato de sodio o ion bicarbonato (HCO_3^-).

Otro mecanismo utilizado por la célula tubular para regular el pH es la secreción de amoniaco (NH_3). La glutamina se metaboliza generando NH_3. Cuando éste ingresa al filtrado, un ion de sodio ingresa a la célula tubular y luego a los capilares. Los iones hidrógeno y el amoniaco se secretan en intercambio por sodio en el filtrado, lo que produce el regreso del bicarbonato de sodio a la circulación.

TRASTORNOS DEL EQUILIBRIO ÁCIDO-BASE

Se deben a anomalías metabólicas o respiratorias, e incluyen los siguientes:

Acidosis respiratoria

Esta alteración se presenta cuando existe excreción inadecuada de CO_2 por los pulmones, aun cuando exista una producción normal de este gas. El nivel de PCO_2 aumenta hasta que los pulmones excretan CO_2, de modo que la producción y excreción se equilibran.

La hipercapnia resultante (exceso de CO_2 en la sangre) produce entonces acidosis sistémica. La PCO_2 elevada es amortiguada por los *buffer* no bicarbonato, como las proteínas en el líquido extracelular, y fosfato, hemoglobina, otras proteínas y lactato dentro de las células.

El incremento de la PCO_2 estimula al riñón a excretar cationes hidrógeno, reabsorber y producir más bicarbonato, incrementando los niveles plasmáticos de esta molécula por encima de lo normal, regresando el pH a la normalidad.

La hipercapnia de la acidosis respiratoria puede provocar hipertensión intracraneal, cefaleas, vasodilatación y aumento del flujo sanguíneo cerebral.

Acidosis metabólica

La producción aumentada o la excreción inadecuada de iones hidrógeno y la pérdida excesiva de bicarbonato, ya sea por la orina o en la materia fecal, provocan esta alteración. El pH sérico disminuye a menos de 7.35, lo que estimula al centro respiratorio, incrementando la frecuencia respiratoria con aumento de la excreción de CO_2, con lo que los niveles plasmáticos de ácido carbónico caen, corrigiendo la acidosis.

La acidosis también incrementa la producción de amoniaco y la excreción del catión hidrógeno en la orina, formándose de nuevo bicarbonato, ayudando a regresar el nivel plasmático de esta molécula a la normalidad, si el factor causal ha sido tratado. A medida que se forma más bicarbonato, la frecuencia respiratoria disminuye y la PCO_2 se normaliza.

Alcalosis respiratoria

Se produce cuando existen pérdidas pulmonares excesivas de CO_2 en presencia de producción normal de este gas, produciendo una disminución en la PCO_2 y una elevación del pH. Entonces los cationes hidrógeno son liberados de los *buffer* corporales para disminuir el bicarbonato plasmático. La excreción de bicarbonato por el riñón aumenta lentamente y reduce los niveles de bicarbonato plasmáticos para compensar la pérdida excesiva de CO_2. Luego el pH regresa a la normalidad.

Alcalosis metabólica

Esta alteración se presenta cuando hay una concentración plasmática elevada de bicarbonato por encima de 25 mEq/L en los niños y mayor de 27 mEq/L en los adultos, o la reducción en la concentración del catión hidrógeno eleva el pH plasmático por encima de 7.45.

La alcalosis metabólica se puede presentar debido a una pérdida excesiva del catión hidrógeno en los vómitos persistentes o aspiración gástrica prolongada, donde se pierde ácido clorhídrico (HCl). También se puede presentar si se administran cantidades excesivas de bicarbonato o si se incrementa la reabsorción de éste por los túbulos renales. La frecuencia respiratoria disminuye y aparece bicarbonato en la orina (con un pH mayor de 8.5 a 9, sobre todo si se asocia con deficiencia de potasio).

Trastornos mixtos

En ciertas situaciones se pueden presentar trastornos mixtos del equilibrio ácido-base cuando más de una causa primaria es responsable de la alteración, como en el caso de la insuficiencia cardiaca congestiva y el síndrome de dificultad respiratoria.

www.elsolucionario.org

MOLÉCULAS ORGÁNICAS

La bioquímica celular está basada en los compuestos derivados del carbono (C), elemento que forma cerca de medio millón de compuestos orgánicos. La mayor parte de los compuestos químicos de los seres vivos contienen esqueletos de carbono con enlaces covalentes. Estas moléculas se denominan compuestos orgánicos. La mayoría de los compuestos orgánicos forman la estructura de los seres vivos o se usan en su metabolismo, ya que todos ellos contienen una reserva de energía potencial, la cual ponen a disposición en sus reacciones exotérmicas o exergónicas (se libera energía).

Los compuestos del carbono fabricados por las células se dividen en cuatro grupos: carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, de los cuales los tres primeros sirven como fuentes de energía para los organismos. El rompimiento de las moléculas orgánicas complejas libera energía. El ciclo de síntesis y degradación de las biomoléculas, con la liberación o almacenamiento de energía, depende de la fuente externa para obtención de energía (alimentos) y para el reemplazo de las moléculas que se han desintegrado totalmente durante el metabolismo.

Los compuestos orgánicos son el principal componente estructural de células y tejidos. Participan en las reacciones metabólicas y proveen energía para los procesos de la vida.

Un átomo de carbono tiene un total de seis electrones, dos de ellos en el primer nivel de energía y cuatro en el segundo. Con cuatro electrones en su nivel externo de energía (valencia), cada átomo de carbono puede formar cuatro enlaces covalentes con otros átomos, incluyendo otros átomos de carbono. Estos átomos forman enlaces covalentes simples muy estables unos con otros. Se pueden formar grandes cadenas de carbono de la siguiente manera: -C-C-C-C-C.

Dos átomos de carbono pueden compartir, uno con otro, dos pares de electrones para formar enlaces dobles (-C=C-). En algunos compuestos se pueden formar triples enlaces (-C≡C-). Las cadenas de carbono pueden ser ramificadas o no ramificadas. Los átomos de carbono también pueden formar anillos cerrados (ciclos) o aromáticos.

El átomo de carbono puede unirse con más elementos distintos que cualquier otro átomo. El hidrógeno, el oxígeno y el nitrógeno son de los átomos que con mayor frecuencia se unen a él. Los compuestos orgánicos constituidos solamente por carbono e hidrógeno se denominan hidrocarburos.

Grupos funcionales

Son grupos de átomos que pueden establecer distintos tipos de uniones con otras moléculas, tales como enlaces covalentes (ésteres, éteres, amidas, etc.) iónicos, puentes de hidrógeno, interacciones de van der Waals o hidrofóbicas con otras moléculas. Cada tipo de compuesto orgánico se caracteriza por la presencia de uno o más grupos funcionales específicos. Los alcoholes tienen grupos funcionales llamados radicales hidroxilo (OH^-), mientras que el grupo funcional carbonilo resulta de una doble unión entre el carbono y el oxígeno (C=O); si el carbonilo está ubicado en un carbono primario (extremo de la cadena carbonada) el grupo funcional es un aldehído, pero si está unido a un carbono secundario (en mitad de una cadena carbonada) el grupo funcional es una cetona (figura 1-10).

El nitrógeno también puede unirse a un hidrógeno para formar un grupo amino; la reacción entre un grupo carboxilo y un grupo amino con pérdida de una molécula de agua origina una amida. En el grupo carboxilo (ácido) el carbono está unido simultáneamente a un oxígeno por una doble unión y a un hidroxilo. La reacción entre un grupo carboxilo (ácido) y un grupo hidroxilo (alcohólico) con pérdida de agua forma un enlace éster. Además, los grupos funcionales con carga positiva o negativa de las moléculas biológicas son solubles en agua, ya que se asocian con fuerza a las moléculas polares de ésta. Los compuestos que contienen grupos funcionales polares sin carga tienden a ser solubles en agua debido a que los grupos polares atraen a las moléculas de agua, con las que forman puentes de hidrógeno.

Los grupos funcionales que son polares interactúan, además, con otros iones con carga eléctrica o con otros grupos polares. Si se conocen los grupos funcionales en un compuesto orgánico se puede predecir su comportamiento químico.

La mayoría de los compuestos celulares contienen uno o más grupos funcionales, como los aminoácidos,

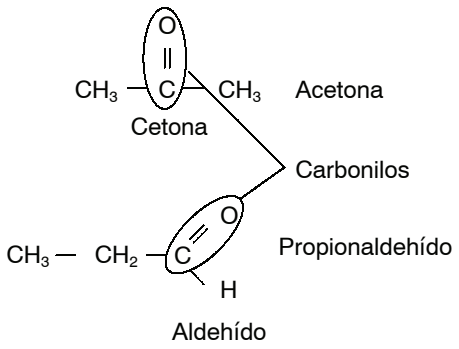


Figura 1-10. Grupos carbonilos, cetonas y aldehídos.

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

que tienen por lo menos dos grupos funcionales: un grupo amino y uno carboxilo.

Los enlaces entre carbono e hidrógeno son no polares, y forman un grupo funcional constituido sólo por enlaces carbono-hidrógeno, como el grupo etilo (-CH_2 -CH_2-) o metilo (-CH_3). Los enlaces oxígeno-hidrógeno y nitrógeno-hidrógeno son polares; tienen una carga eléctrica parcial positiva en el polo de la molécula de hidrógeno y una carga eléctrica negativa parcial correspondiente al oxígeno o al nitrógeno. Por esta razón, los radicales amino (-NH_2) e hidroxilo (-OH) son polares. Los enlaces dobles formados entre el carbono y el oxígeno (C=O) también son polares; hay una carga positiva parcial correspondiente al carbono y una negativa correspondiente al oxígeno; por eso, los radicales carboxilo y aldehído son polares.

Biopolímeros o biomoléculas

Las moléculas de importancia biológica, como las proteínas, los polisacáridos, los lípidos y los ácidos nucleicos, son muy grandes, y están constituidas por cientos o miles de átomos. Estas grandes moléculas se denominan polímeros biológicos (biopolímeros) o macromoléculas. Las células forman polímeros al unir pequeños compuestos orgánicos, llamados monómeros, los cuales pueden agruparse para formar una variedad casi infinita de moléculas más grandes. Los miles de compuestos orgánicos presentes en las células se construyen a partir de unos 40 monómeros simples y pequeños. Estos pequeños compuestos se combinan en cadenas de subunidades similares (figura 1-11).

El proceso de síntesis mediante el cual los monómeros se unen por enlaces covalentes para formar polímeros se denomina condensación. Durante la combinación de los monómeros se pierde el equivalente de una molécula de agua, por lo que a veces se utiliza el término de deshidratación para referirse a este proceso. Cabe mencionar que el proceso de síntesis requiere energía y es regulado por diversas enzimas. Los polímeros pueden degradarse en sus monómeros mediante hidrólisis (*hidros,* agua, y *lisis,* ruptura: romper con agua), proceso catalizado también por enzimas hidrolasas. Los enlaces

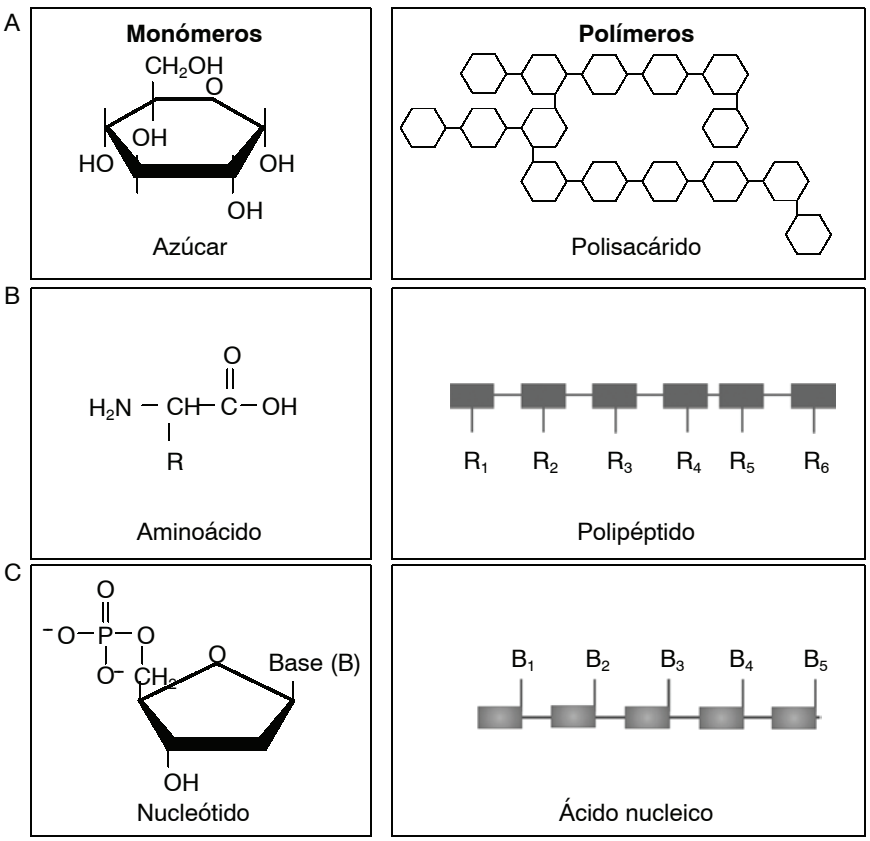


Figura 1-11. Biopolímeros. ***A.*** Los polímeros de monosacáridos constituyen polisacáridos, como el glucógeno, el almidón o la celulosa. ***B.*** Los monómeros de los 20 tipos comunes de aminoácidos se unen en incontables combinaciones (R) y forman los polímeros llamados proteínas. ***C.*** Los ácidos nucleicos son polímeros de nucleótidos, que a diferencia de los anteriores monómeros se forman de la unión de tres moléculas diferentes: una base nitrogenada (B), un monosacárido y una molécula de ácido fosfórico.

www.elsolucionario.org

entre monómeros se rompen por adición de una molécula de agua. Un hidrógeno de la molécula de agua se une a un monómero y el radical hidroxilo restante se une al monómero vecino.

Los cuatro grupos principales de biomoléculas en los seres vivos son: proteínas, polisacáridos, lípidos y ácidos nucleicos. Cada uno de estos grupos cumple una determinada función en el interior de las células.

1. Las proteínas son los biopolímeros más abundantes dentro de las células, y representan 50% o más de su peso seco. Sus funciones son muy versátiles y pueden ser estructurales, catalíticas, etc.
2. Los lípidos tienen dos funciones principales: almacenan energía y forman las membranas celulares.
3. Los polisacáridos, además de almacenar energía, realizan funciones estructurales extracelulares y de reconocimiento molecular.
4. Los ácidos nucleicos almacenan y heredan la información genética.

Isómeros

Son los compuestos que tienen la misma fórmula molecular, pero diferente estructura, así como propiedades físicas y químicas. Las células distinguen entre dos isómeros, de los cuales generalmente uno es biológicamente activo y el otro no. Se conocen tres tipos de isómeros: estructurales, enantiómeros y geométricos, de los cuales los dos últimos son de importancia biológica.

Isómeros ópticos o enantiómeros

Estas moléculas corresponden a una imagen en espejo de otra molécula. Debido a que los cuatro grupos ligados a un átomo simple de carbono se ubican en los vértices del tetraedro, si los cuatro grupos son diferentes entre sí, el carbono central se denomina asimétrico o quiral (del griego *keirós,* mano). Así pues, los cuatro grupos se ubican alrededor del carbono central de las dos formas distintas, que constituyen imágenes en espejo la una de la otra. Estas dos moléculas son enantiómeros si no se sobreponen una con otra, sin importar cuánto se roten en el espacio. Estos isómeros ópticos se denominan levógiros (L) o dextrógiros (D), según la configuración absoluta de los grupos ligados al tetraedro del átomo de carbono. El gliceraldehído (compuesto de tres carbonos) sirve de base para la denominación de todos los enantiómeros. El isómero D de cada compuesto es aquél cuyo último carbono asimétrico tiene la misma orientación que el D-gliceraldehído, mientras que las moléculas relacionadas con el L-gliceraldehído se denominan L-isómeros.

Cuando se sintetizan compuestos orgánicos en laboratorios se produce una mezcla que contiene cantidades iguales de isómeros L y D (racémicos). En las células sólo se produce uno de los dos enantiómeros de un compuesto. Por ejemplo, la mayor parte de los azúcares son isómeros D. Aunque tienen propiedades químicas similares y propiedades físicas idénticas (excepto en cuanto a la dirección en la cual rotan la luz polarizada en un plano), las células distinguen entre dos isómeros, y sólo uno de ellos es biológicamente activo.

Isómeros geométricos

Son compuestos idénticos con respecto a sus enlaces covalentes, pero difieren en el orden en el cual los grupos se distribuyen en el espacio. Los isómeros geométricos, también se denominan *cis-trans*, y se localizan en ciertos compuestos con enlaces dobles de carbono a carbono. El término *cis* se aplica cuando los compuestos más grandes se localizan en un mismo lado del doble enlace, pero si están en lados opuestos del doble enlace el compuesto se llama isómero *trans*. Debido a que los enlaces dobles no son flexibles como los simples, los átomos ligados a carbonos en un enlace doble no rotan con libertad alrededor del eje de enlace.

Proteínas

Proteína (*protos*) significa lo primero, lo inicial. Proteo, dios marino de la mitología griega, cambiaba de forma a voluntad. Son macromoléculas indispensables en la química de la vida, tanto en la estructura como en la función; además, contribuyen a la fuerza de tracción. Algunas son enzimas, anticuerpos u hormonas. En todas se encuentra un gran porcentaje de nitrógeno, así como de oxígeno, hidrógeno y carbono. En la mayor parte de ellas existe también azufre, y en algunas fósforo y hierro. Las proteínas se forman por la unión de moléculas más simples llamadas aminoácidos, que los vegetales sintetizan a partir de nitratos y sales amoniacales del suelo, mientras que los animales reciben sus aminoácidos esenciales de las plantas o de otros animales. Las proteínas de origen animal son de mayor valor nutritivo que las vegetales porque aportan los nueve aminoácidos esenciales para la vida en mayor cantidad. La degradación de las proteínas se llama catálisis y la síntesis anabólisis. Las reacciones químicas involucran catalizadores, las enzimas; la mayoría de las enzimas son

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

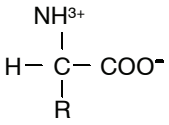


Figura 1-12. Esquema del ion dipolar zwitterión que forman los aminoácidos en disolución acuosa.

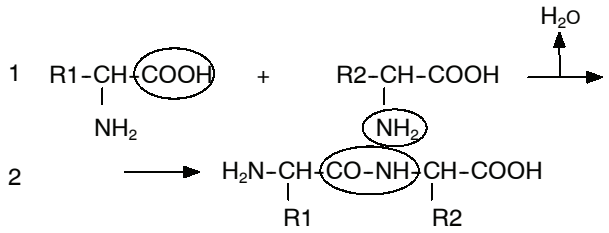


Figura 1-13. Formación del enlace peptídico.

proteínas. Las proteínas son macromoléculas como mínimo de 6 kD, están formadas por 20 aminoácidos diferentes; no todos los aminoácidos pueden ser sintetizados por el organismo, así que tienen que ser captados en la dieta. Los aminoácidos libres forman un *pool*, tienen un grupo amino NH_2 y un grupo carboxilo COOH; cada aminoácido presenta una cadena lateral (R), y a pH neutro se encuentran como iones bipolares.

Los aminoácidos con cadenas laterales no polares son hidrófobos, y los que tienen cadenas laterales polares son hidrófilos. Los aminoácidos básicos tienen carga positiva debido a la disociación del grupo amino en su cadena lateral. Los aminoácidos ácidos tienen cadenas laterales con un grupo carboxilo, el cual se disocia, de manera que el grupo R tiene una carga negativa. Las cadenas laterales ácidas o básicas son iónicas y, por tanto, son hidrófilas.

En disolución acuosa, los aminoácidos muestran un comportamiento anfótero porque pueden ionizarse, dependiendo del pH, como un ácido liberando protones y quedando el grupo carboxilo ($-COO^-$), como base $-NH_2$ que, al captar protones, queda como ($-NH_3^+$); también pueden aparecer como ácido y base a la vez. En este caso los aminoácidos se ionizan doblemente, apareciendo una forma dipolar iónica denominada *zwitterión* (figura 1-12).

Los péptidos pueden crecer incorporando aminoácidos porque siempre hay un extremo NH_2 terminal y un COOH terminal (figura 1-13). Para nombrar el péptido se empieza por el extremo NH_2. Si el primer aminoácido fuera metionina y el segundo serina, se formaría el péptido metionil-serina.

Las cadenas polipeptídicas pueden contener cadenas laterales. La secuencia de aminoácidos es específica para cada proteína, la cual determina su estructura primaria, misma que puede tener diferencias sin que se altere su conformación. La conformación proteica se divide en estructuras secundaria, terciaria y cuaternaria. La estructura secundaria tiene forma de espiral denominada hélice α o lámina β. La hélice α tiene enlaces de hidrógeno entre los grupos CO y NH; en las láminas β tienen los mismos enlaces, pero en sitios diferentes. Si las fibras β van en la misma dirección se llama lámina β paralela, y si van en dirección opuesta se denomina lámina β antiparalela. Las zonas de hélice α se representan con cilindros y las láminas β con flechas (figura 1-14). La estructura terciaria se da por plegamientos de la cadena polipeptídica, que le confiere una forma globular con dominios o zonas de la proteína con características es-

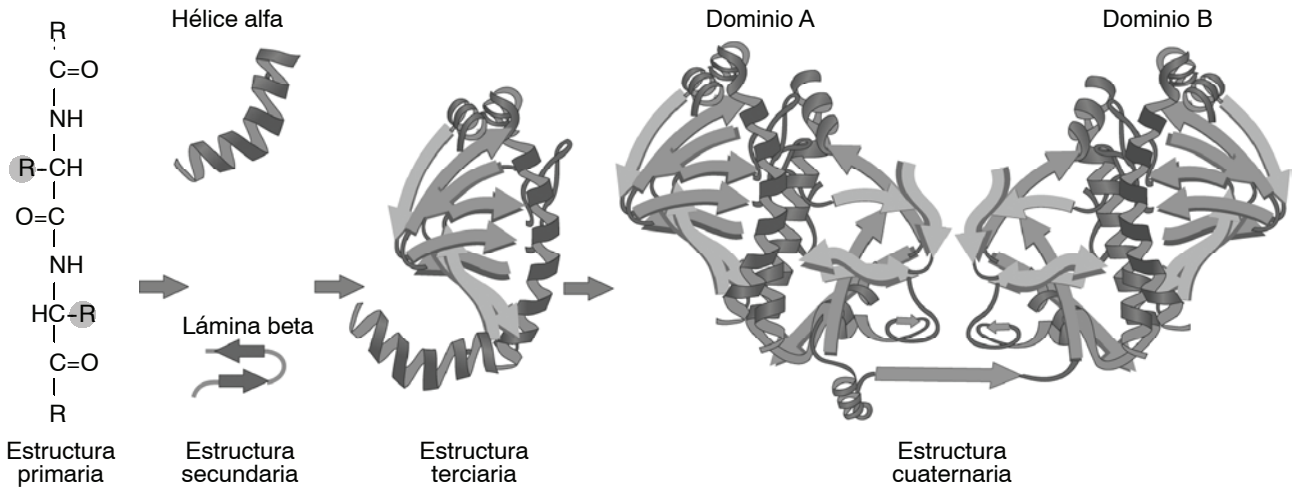


Figura 1-14. Estructuras de las proteínas según su secuencia de aminoácidos, la cual determina su estructura primaria y establece su conformación, que se puede dividir en estructuras secundaria, terciaria y cuaternaria.

www.elsolucionario.org

tructurales definidas. En una molécula de proteína puede haber más de un dominio, y este hecho está relacionado con la función de la misma. Los dominios suelen ser muy conservados a lo largo de la evolución. Algunos de estos dominios pueden acoplarse a las secuencias de DNA activando sus genes; otros realizan funciones catalíticas o permiten la transferencia de energía, mediante el rompimiento de un enlace fuerte del ATP.

En las proteínas pequeñas hay un solo dominio y en las grandes más de 20, los cuales tienen una función específica. La estructura cuaternaria se da porque varias cadenas polipeptídicas se pliegan en conjunto; cada cadena es una subunidad, por lo cual la proteína es multimérica; además, la conformación determina la función de una proteína (figura 1-14).

Desde el punto de vista nutricional el valor químico o puntuación química de las proteínas se define como el cociente entre los miligramos de aminoácido limitante existente por gramo de la proteína en cuestión y los miligramos del mismo aminoácido por gramo de una proteína de referencia. El aminoácido limitante es aquél en el que el déficit es mayor comparado con la proteína de referencia, es decir, aquél que, una vez realizado el cálculo, proporciona un valor químico más bajo. Se han fijado distintas proteínas de referencia dependiendo de la edad, ya que las necesidades de aminoácidos esenciales son distintas. Las proteínas de los cereales son en general muy deficientes en lisina, mientras que las de las leguminosas lo son en aminoácidos azufrados, como metionina y cisteína. Por esta razón, las proteínas de origen animal tienen en general composiciones más próximas a la considerada ideal. La mayoría de las proteínas son específicas de especie, ya que varían de una especie a otra aunque desempeñen la misma función, como la insulina.

Las principales funciones biológicas de las proteínas son las siguientes:

1. Función estructural.
2. Función enzimática.
3. Función hormonal.
4. Función de transporte.
5. Función homeostática.
6. Función de defensa inmunitaria.
7. Reconocimiento de señales químicas.
8. Funciones reguladoras.
9. Función contráctil.
10. Transducción de señales (cambio en la naturaleza fisicoquímica de señales), como la rodopsina de la retina, que transduce un fotón luminoso en un impulso nervioso.
11. Funciones de reserva energética.

La desnaturalización afecta las fuerzas de unión; por lo tanto, se afecta la conformación de la proteína. Las proteínas se clasifican en fibrosas o globulares. En las proteínas fibrosas las cadenas de polipéptidos se disponen en láminas largas; en las proteínas globulares las cadenas de polipéptidos se encuentran plegadas en forma estrecha, a fin de producir una molécula compacta, de forma esférica.

La mayor parte de las enzimas son proteínas globulares. Como mencionamos, existen varios niveles de organización en una molécula proteínica: estructura primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria.

Estructura primaria

La secuencia de aminoácidos en una cadena de polipéptidos determina su estructura primaria. Esta secuencia está codificada en la información genética del organismo y la función de una proteína depende de su secuencia y de la forma que ésta adopte. La insulina pancreática fue la primera proteína cuya secuencia de aminoácidos en la cadena polipeptídica pudo determinarse en 1980 por Bell y col. Contiene 51 monómeros de unidades de aminoácidos en dos cadenas polipeptídicas.

Estructura secundaria

Es la disposición de la secuencia de aminoácidos en el espacio. Esta disposición se debe a las interacciones entre los átomos del esqueleto regular de la cadena peptídica. Los grupos funcionales no intervienen en la formación de enlaces de la estructura secundaria.

Existen dos tipos de estructura secundaria: la alfa-hélice y la conformación beta.

La alfa-hélice es una estructura geométrica uniforme, en cada giro se encuentran 3.6 aminoácidos. La estructura helicoidal se forma mediante enlaces por puentes de hidrógeno entre el -C=O de un aminoácido y el -NH- del cuarto aminoácido que le sigue en los giros sucesivos de la espiral. En la estructura alfa-helicoidal, los puentes de hidrógeno ocurren entre átomos de una misma cadena peptídica. La alfa-hélice es la unidad estructural básica de las proteínas fibrosas de la lana, el cabello, la piel y las uñas, cuyas fibras son elásticas porque los enlaces de hidrógeno pueden reformarse. El segundo tipo de estructura secundaria es la lámina beta plegada. En estas estructuras los puentes de hidrógeno pueden ocurrir entre diferentes cadenas polipeptídicas (lámina intercatenaria); cada cadena en forma de zigzag está completamente extendida y los enlaces de hidrógeno ocasionan la formación de la estructura en forma de lámina.

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

También se pueden formar láminas plegadas entre regiones diferentes de una misma cadena peptídica (lámina intracatenaria). Esta estructura es más flexible que elástica. La proteína de la seda fibroína tiene una estructura de lámina plegada beta. El núcleo de muchas proteínas globulares también está formado por láminas beta.

Las estructuras laminares intracatenarias ocurren sobre todo en proteínas globulares, y las intercatenarias entre las fibrosas. En los dos casos son posibles dos formas laminares, según el alineamiento de las diferentes cadenas o segmentos: si éstos se alinean en la misma dirección (de extremo N- a C-terminal) la disposición es una lámina beta paralela, pero si están alineados en sentido opuesto la lámina es beta antiparalela. La estructura antiparalela es más estable porque los dipolos C=O y N-H están mejor orientados para una interacción óptima.

En las proteínas fibrosas la estructura es exclusivamente helicoidal (colágeno) o exclusivamente laminar (fibroína), pero en las proteínas globulares la estructura secundaria siempre tiene una porción denominada aleatoria (zonas de conexión); estas proteínas pueden ser parcialmente helicoidales y aleatorias, parcialmente laminares y aleatorias, totalmente aleatorias o una mezcla variable de partes de ordenamiento helicoidal, laminar y aleatorio (figura 1-14).

Estructura terciaria

La estructura terciaria es la disposición de la estructura secundaria de un polipéptido al plegarse sobre sí misma, originando una conformación globular (dominio). Esta conformación globular facilita la solubilidad de las proteínas en agua para realizar sus funciones biológicas adecuadamente; la estructura terciaria está determinada por la forma que adopta cada cadena polipeptídica. Esta estructura tridimensional está determinada por cuatro factores que se interaccionan entre los grupos R de los aminoácidos:

1. **Atracción iónica entre los grupos R (puentes eléctricos)** con cargas positivas y negativas.
2. **Puentes de hidrógeno** entre los grupos R de las subunidades de aminoácidos en asas cercanas intracatenarias.
3. **Interacciones hidrófobas** de los grupos R no polares que se desplazan hacia el centro de la estructura globular, lejos del agua circundante.
4. **Puentes disulfuro** covalentes (-S-S-), los cuales unen los átomos de azufre de dos subunidades de cisteína. También pueden unir dos porciones de una misma cadena o de cadenas distintas.

Estructura cuaternaria

Esta estructura se forma de la unión con enlaces débiles de varias cadenas polipeptídicas con estructura terciaria para formar un complejo proteico. Cada una de estas cadenas polipeptídicas se denomina protómero. El número de protómeros varía desde dos, como en la hexocinasa, cuatro, como en la hemoglobina, o muchos, como las cápsides virales con varias docenas de unidades proteicas.

La estructura de las proteínas determina su actividad biológica. De las innumerables conformaciones posibles de una proteína generalmente hay una que predomina, la cual es la más estable, y en ese caso se dice que la proteína se encuentra en su estado nativo (proteína nativa).

Los cambios en la estructura tridimensional de una proteína alteran su actividad biológica. Cuando una proteína se calienta o se trata con algunas sustancias químicas, su estructura terciaria se distorsiona y la cadena peptídica en espiral se desdobla para dar lugar a una conformación aleatoria. Este cambio en la forma de la proteína y la pérdida de su actividad biológica se denomina desnaturalización, la cual por lo general no puede revertirse. La degradación proteica es llevada a cabo por proteasas o peptidasas que hidrolizan algunas o todas las uniones peptídicas, con lo que la proteína se reduce a sus unidades constitutivas, los aminoácidos, que pueden luego ser utilizados para construir moléculas de la misma proteína o de otra. El proceso de hidrólisis destruye todas las estructuras, incluso la primaria, y puede efectuarse por ácidos o álcalis concentrados a elevadas temperaturas o por vía enzimática.

Los 20 aminoácidos que forman las proteínas humanas se dividen en esenciales y no esenciales. Los primeros no pueden ser sintetizados en el organismo, y por ende deben incorporarse en la dieta mediante ingesta, como la histidina, la isoleucina, la leucina, la lisina, la metionina, la fenilalanina, la treonina, el triptófano y la valina. Los no esenciales son aquéllos que sí pueden sintetizarse en el organismo, como la alanina, la arginina, la asparagina, el ácido aspártico, la cisteína, el ácido glutámico, la glutamina, la glicina, la prolina, la serina y la tirosina.

Las proteínas pueden ser simples o conjugadas. Las simples u holoproteínas, al hidrolizarse, producen únicamente aminoácidos, mientras que las proteínas conjugadas o heteroproteínas, al hidrolizarse, producen, además de aminoácidos, otros componentes orgánicos o inorgánicos.

Las proteínas simples se clasifican, según su conformación espacial, en:

www.elsolucionario.org

1. Fibrosas:
   - **a.** Queratinas.
   - **b.** Elastinas.
   - **c.** Colágenos.
   - **d.** Fibroínas, etc.
2. Globulares:
   - **a.** Albúminas: como la lactoalbúmina (leche), la seroalbúmina (sangre) y la ovoalbúmina (huevo).
   - **b.** Hormonas: como la insulina, la hormona del crecimiento, la prolactina y la tirotropina.
   - **c.** Enzimas: como las hidrolasas, las oxidasas, las ligasas, las liasas, etc.
   - **d.** Prolaminas: como la hordeína (cebada), la zeína (maíz), la gliadina (trigo), etc.
   - **e.** Gluteninas: como la orizanina (arroz) y la glutenina (trigo), etc.

La porción no proteica de una proteína conjugada se denomina grupo prostético. Las proteínas conjugadas se clasifican según sus grupos prostéticos en:

1. Lipoproteínas:
   - **a.** De alta densidad (HDL), con 50% de proteína y PM 10^5.
   - **b.** De baja densidad (LDL), con 25% de proteína y PM 10^6.
   - **c.** De muy baja densidad (VLDL), con 8% de proteína.
2. Glucoproteínas:
   - **a.** Ribonucleasas.
   - **b.** Mucoproteínas.
   - **c.** Anticuerpos (inmunoglobulinas).
   - **d.** Hormona luteinizante (LH).
   - **e.** Gonadotropina coriónica humana (GCH), etc.
3. Cromoproteínas:
   - **a.** Hemoglobina.
   - **b.** Hemocianina.
   - **c.** Mioglobina.
   - **d.** Citocromos, etc.
4. Nucleoproteínas:
   - **a.** Ribosomas.
   - **b.** Nucleosomas.
   - **c.** Telomerasa, etc.

Evolución de las proteínas

Existen unas 3 000 proteínas distintas en una bacteria, y más de 40 000 en un ser humano, aunque la mayoría no han sido descubiertas. La función de las proteínas está determinada por su estructura estereoquímica (arreglo de sus átomos en el espacio).

En teoría, podría haber infinidad de arreglos posibles, pero sólo existen unas pocas estructuras estereoquímicas básicas. Estas estructuras básicas corresponden a proteínas ancestrales que dieron origen a todas las proteínas actuales en los seres vivos y que formaban parte de la primera célula sobre la Tierra.

Lípidos

Son un conjunto de biomoléculas orgánicas, químicamente heterogéneas, insolubles en agua y solubles en solventes orgánicos no polares como el cloroformo, el éter, el benceno, el xilol, etc. Se encuentran como componentes estructurales y reserva de energía. Su distribución es universal en las células y organismos, y cumplen funciones esenciales. En su estructura existen largas cadenas hidrocarbonadas lineales o cíclicas que le confieren a la molécula su hidrofobicidad y su afinidad por los solventes orgánicos no polares. Su peso molecular es bajo y no forman macromoléculas, como los carbohidratos, las proteínas y los ácidos nucleicos. Al ser moléculas pequeñas, son una buena fuente de energía.

Por su poca solubilidad en agua los lípidos no circulan en forma libre, sino asociados a diversas proteínas, como los quilomicrones en el torrente sanguíneo, cuyo peso molecular (PM) es de 10^9 a 10^{10} daltons (con un contenido de 2% de proteína y alrededor de 90% de glicéridos). Dentro de la célula los lípidos circulan unidos a proteínas transportadoras específicas, como la proteína transportadora de fosfatidilcolina (PC-BP: *phosphatidylcholine binding protein*), la proteína transportadora de ácidos grasos (FABP, *fatty acid binding protein*), etc.

Clasificación

Por su composición química, los lípidos se clasifican en simples y complejos (cuadro 1-3).

Esteroides

Su estructura difiere del resto de los lípidos; tienen sus átomos de carbono dispuestos en cuatro anillos entrelazados; tres de los anillos contienen seis átomos y el cuarto sólo tiene cinco, formando la estructura molecular ciclopentanoperhidrofenantreno. La longitud y la estructura de las cadenas laterales que parten de esos anillos hacen la diferencia entre un tipo de esteroide y otro. Los esteroides se sintetizan a partir de unidades de isopreno. El colesterol en animales, el estigmasterol en vegetales y el ergosterol en hongos son lípidos estructurales. El colesterol tiene un grupo hidroxilo que lo hace

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

Cuadro 1-3. Clasificación de los lípidos de acuerdo a su composición química

Lípidos simples que contienen C, H, O	Lípidos complejos que contienen C, H, O, N, S, P
Esteroides	Esfingolípidos
Ácidos grasos	Fosfolípidos
Eicosanoides	
Glicéridos	
Céridos	
Terpenos	

hidrofílico, pero tiene además un esqueleto hidrocarbonado hidrofóbico, por lo que la molécula es anfipática o anfifílica (hidrofílico e hidrofóbico al mismo tiempo), al igual que los fosfolípidos (figura 1-15).

Los esteroides de importancia biológica en el ser humano son el colesterol, las hormonas sexuales masculinas y femeninas, las hormonas suprarrenales y las sales biliares. Algunos esteroides actúan como detergentes intestinales (ácidos biliares, que es la forma en que se elimina el colesterol del organismo).

Ácidos grasos

Son ácidos monocarboxílicos de 4 a 36 átomos de carbono. Los más frecuentes son lineales, de número par de átomos de carbono. Si se presentan enlaces dobles se denominan ácidos grasos insaturados y poseen configuración geométrica *cis*. Un extremo es un grupo carboxílico (ácido) hidrofílico, mientras que la cadena hidrocarbonada es hidrofóbica o anfipática. Sus propiedades físicas dependen del número de enlaces dobles y de la longitud de la cadena. En las células se oxidan a CO_2 y H_2O, liberando energía. Los ácidos grasos linoleico y linolénico son esenciales para el ser humano y deben ingerirse en la dieta, debido a que los animales, a diferencia de los vegetales, no pueden introducir dobles ligaduras más allá del carbono 9. En las células, los ácidos grasos se encuentran esterificados (formando uniones éster con alcoholes), sobre todo en los fosfolípidos y en los triglicéridos.

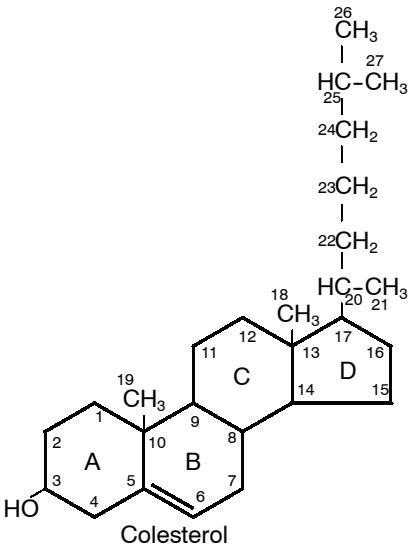


Figura 1-15. Estructura química del colesterol. Este lípido es un componente estructural de las membranas celulares animales, y a partir de él se forman los demás esteroides. Contiene 27 átomos de carbono.

Eicosanoides

Son un grupo de compuestos derivados del ácido araquidónico (ácido 5,8,11,14-eicosatetraenoico), un ácido graso poliinsaturado de 20 átomos de carbono (de donde proviene su nombre: *eicosano* = veinte) (figura 1-16).

Tienen una amplia gama de actividades biológicas como hormonas o como efectores en procesos inflamatorios. Son el prototipo de mediadores locales, liberados *in situ* ante diversos estímulos, como es el caso de las prostaglandinas (PG), los tromboxanos (TX) y los leucotrienos (LT).

Las PG regulan la acción hormonal; algunas provocan la contracción de la musculatura lisa, como la PGE_2. La prostaciclina (PGI) es un vasodilatador que impide la agregación plaquetaria. El ácido acetilsalicílico (Aspirina®) y los glucocorticoides como el cortisol y la dexametasona tienen efectos antiinflamatorios por inhibición de la síntesis de PG. El tromboxano A_2 se sintetiza en las plaquetas y tiene efectos opuestos a la prostaciclina, ya que es vasoconstrictor y estimula la agregación plaquetaria.

Los leucotrienos tienen tres dobles enlaces conjugados (*trieno*). Son mediadores locales en reacciones de tipo alérgico e inflamatorio, y se combinan generalmente con el tripéptido glutatión.

Glicéridos

Son ésteres de un trialcohol denominado glicerol (1,2, 3–trihidroxi-propanol) con una, dos o tres moléculas de

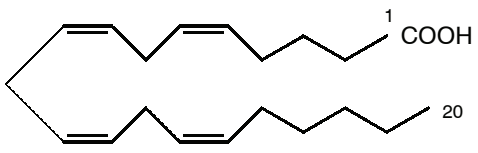


Figura 1-16. Esqueleto químico del ácido araquidónico. Es un ácido graso esencial omega 6.

www.elsolucionario.org

un ácido graso, para formar un monoglicérido, diglicérido o triglicérido, respectivamente (figura 1-17).

Triglicéridos o triacilgliceroles

Son los lípidos más abundantes en las células, y constituyen además una importante fuente de energía, ya que producen más del doble de energía (por gramo) que los carbohidratos y proteínas. 1 g de lípidos provee 9 Kcal de energía, mientras que 1 g de carbohidratos provee 4 Kcal, igual que 1 g de proteínas. Esto se debe a que los lípidos están más reducidos y, por lo tanto, liberan más energía al oxidarse a CO_2 y H_2O que los carbohidratos, y además, al ser hidrofóbicos, no contienen agua de hidratación que se sume a su peso.

Así pues, los triglicéridos son una forma eficiente de almacenamiento energético. Los carbohidratos y las proteínas pueden transformarse en lípidos cuando la cantidad de calorías que ingresan en un organismo es mayor que la requerida.

Por el contrario, los lípidos no pueden transformarse en carbohidratos en los animales, pero sí en los vegetales, lo que se aprovecha en algunas semillas para almacenar la energía necesaria para los primeros estadios de vida de la planta.

En la mayoría de las células los triglicéridos se separan en fases en el citoplasma acuoso, formando gotas de reserva en vegetales y en las células animales, ocupando casi todo el citoplasma (adipocitos). En las semillas los triglicéridos actúan como fuente de energía y de precursores biosintéticos.

Los triglicéridos en los que predominan los ácidos grasos saturados se denominan grasas, y tienen mayor punto de fusión, como las grasas animales, que son sólidas a temperatura ambiente. En los aceites vegetales, que son líquidos a temperatura ambiente, predominan los ácidos grasos insaturados (figura 1-17).

Céridos

Son ésteres de ácidos grasos de cadena larga. Son sólidos a temperatura ambiente con sus dos extremos hidrófobos, lo que determina su función impermeabilizante y de protección. En los animales se encuentran en piel, pelos, plumas y exoesqueleto de insectos. En los vegetales forman películas que recubren hojas, flores y frutos. En el plancton (organismos animales y vegetales que viven suspendidos en océanos y mares) los céridos pueden actuar como fuente de energía. Los céridos más comunes son la lanolina (grasa de lana de oveja), la cera de abeja (ésteres del ácido palmítico con alcoholes de cadena larga) y el cerumen del conducto auditivo externo en los seres humanos.

Terpenos

Son moléculas formadas por condensación de unas pocas unidades de isopreno (2-metil-1,3-butadieno). Son frecuentes en los aceites esenciales (sustancias aromáticas) de la plantas. La mayoría son hidrocarburos, aunque algunos contienen funciones oxidadas. Muchas de estas moléculas son vitaminas liposolubles. Entre las vitaminas derivadas del isopreno se encuentra la vitamina A (retinol), un alcohol tetraprenoide; la vitamina E (alfa-tocoferol) y la vitamina K (naftoquinona), esencial para la coagulación sanguínea (antihemorrágica).

Esfingolípidos

Derivan de la esfingosina o 4-esfingenina, un aminoalcohol insaturado de cadena larga. Si el alcohol se esterifica con fosforilcolina se forma la esfingomielina, que forma parte de las membranas de las células nerviosas; pero si en lugar de fosforilcolina se esterifica con carbohidratos, los productos se denominan cerebrósidos (glucocerebrósidos o galactocerebrósidos) o gangliósidos

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

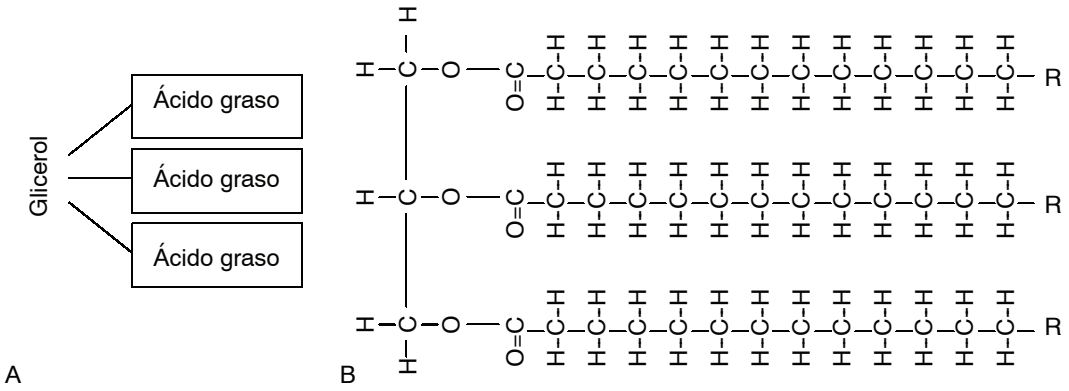


Figura 1-17. Esquema de los triacilgliceroles o triglicéridos ***A.*** Figura resumida. ***B.*** Fórmula desarrollada.

www.elsolucionario.org

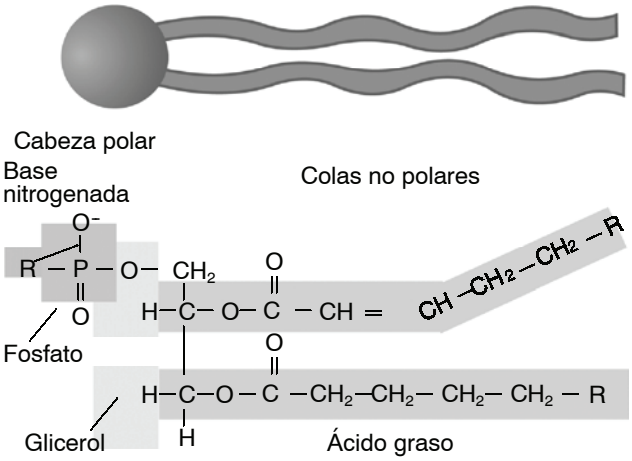


Figura 1-18. Esquema de un fosfolípido. Su estructura química se compone de una molécula de glicerol unida a dos ácidos grasos y a un radical fosfato, que a su vez se enlaza mediante una unión éster con un aminoalcohol, como la etanolamina, la colina o la serina.

(además de monosacáridos tienen ácido siálico, que es el N-acetilneuramínico). Los cerebrósidos y los gangliósidos se localizan también en las neuronas, y por tener glúcidos también se pueden considerar como glicolípidos. Los glicolípidos presentes en las membranas de los cloroplastos son glicéridos en los que un ácido graso está reemplazado por una o dos unidades de galactosa, en las cuales el hidroxilo alcohólico del C_6 puede esterificarse con ácido sulfúrico para formar grupos sulfónicos.

Fosfolípidos o fosfoglicéridos

Se forman de una molécula de glicerol unida a dos ácidos grasos y a un radical fosfato (ácido fosfatídico), que a su vez se enlaza mediante una unión éster con un aminoalcohol, como la etanolamina, la colina o la serina (que además es un aminoácido), o un polialcohol como el glicerol o el inositol (figura 1-18).

Los ácidos grasos le confieren a estas moléculas hidrofobicidad, mientras que la base orgánica y el ácido fosfórico son altamente hidrofílicos, por lo que estas moléculas son también anfipáticas. Las propiedades anfipáticas de estas moléculas lipídicas y su geometría hacen que adopten cierta configuración (micelas) en presencia de agua, ya que los extremos hidrófilos solubles en agua quedan hacia afuera, interactuando con el agua circundante. Los extremos hidrófobos se orientan en el sentido opuesto (figura 1-19).

La membrana celular es una bicapa lipídica (dos capas de fosfolípidos) cuyas moléculas tienen los extremos hidrófobos hacia el centro y las cabezas hidrófilas orientadas hacia el exterior. Los fosfolípidos tienen fun-

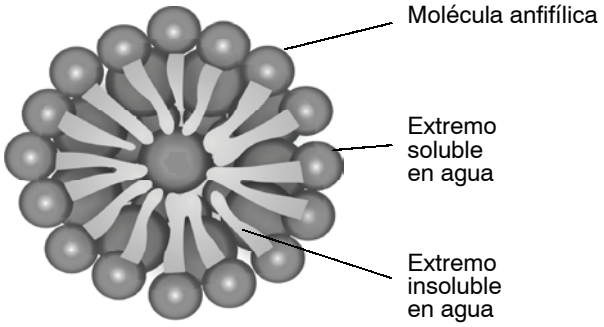


Figura 1-19. Esquema de una micela. Son moléculas anfifílicas porque un extremo es soluble en agua pero el otro no. Se forman de fosfolípidos con sus cabezas polares orientadas hacia el exterior.

ciones estructurales como constituyentes de las membranas biológicas y son mensajeros intracelulares como la fosfatidilcolina, la fosfatidilserina, el fosfatidilinositol, etc. El más frecuente se compone de glicerol esterificado con ácidos grasos y un grupo fosfato.

Hidratos de carbono o carbohidratos

Son fuentes de energía y componentes estructurales. Los carbohidratos contienen átomos de carbono, hidrógeno y oxígeno en una proporción aproximada de un carbono por cada dos hidrógenos y un oxígeno (CH_2O). El término carbohidrato se origina de la proporción 2:1 del hidrógeno con respecto al oxígeno, que es la misma proporción que se observa en el agua (H_2O).

Los monosacáridos más importantes son la ribosa y la desoxirribosa, ambas pentosas; la glucosa es una hexosa, al igual que la galactosa y la fructosa, y pueden encontrarse en forma lineal y cíclica (α y β). Los disacáridos se forman por la unión de dos monosacáridos con eliminación de una molécula de agua; los más importantes son la lactosa, la maltosa y la sacarosa. Los polisacáridos se forman por la unión de varias moléculas de monosacáridos, como el glucógeno. Las moléculas de alfa-glucosa se unen mediante un enlace glucosídico (α1-4), las ramificaciones se presentan por enlaces glucosídicos α1-6. Cuando se hidroliza el glucógeno se liberan moléculas de glucosa y la polimerización forma polímeros encadenando varios monómeros. Los polisacáridos pueden formar compuestos con lípidos y proteínas. Las glicoproteínas se encuentran en las membranas celulares y los glicosaminoglicanos en el tejido conectivo. Los carbohidratos típicos son los azúcares, los almidones y las celulosas. Los azúcares y los almidones sirven de combustible para las células y las celulosas son componentes estructurales de las plantas. Los carbohi-

www.elsolucionario.org

dratos son el grupo de compuestos orgánicos más abundantes en la tierra, y la celulosa, un carbohidrato estructural, es el carbohidrato más abundante, con más de 50% del carbono de las plantas. La madera es celulosa en cerca de 50% y el algodón al menos en 90%.

Monosacáridos

Son azúcares simples que contienen de tres a siete átomos de carbono. Son polialcoholes con función aldehído o cetona. Los carbohidratos más simples tienen tres átomos de carbono y se denominan triosas, como el gliceraldehído, que posee una función aldehído y dos funciones alcohólicas (aldotriosa), y la dihidroxiacetona, con una función cetona y dos funciones alcohólicas (cetotriosa). La ribosa es una pentosa común (aldopentosa) que es componente de los ácidos ribonucleicos (RNA); su derivado desoxigenado, la desoxirribosa, que carece de hidroxilo alcohólico en la posición 2, forma los ácidos desoxirribonucleicos (DNA). La glucosa, la galactosa y la manosa son aldohexosas, mientras que la fructosa es una cetohexosa (figura 1-20).

Todos los monosacáridos, excepto la dihidroxiacetona, tienen uno o más átomos de carbono asimétricos o quirales (las cuatro valencias del carbono están unidas a átomos o grupos atómicos distintos). La aldosa más simple, el gliceraldehído, contiene un solo carbono asimétrico, o centro quiral, y se presenta en forma de dos isómeros ópticos o enantiómeros: el D- y el L-gliceraldehído, que sólo difieren en el sentido en que desvían el plano de la luz polarizada: el primero desvía la luz polarizada hacia la derecha (isómero dextrógiro) y el segundo a la izquierda (isómero levógiro). Para determinar si un monosacárido pertenece a la serie D o L se determina el carbono asimétrico o centro quiral más alejado del grupo aldehído o cetona: si está en el mismo sentido que el D-gliceraldehído es dextrógiro, y si está en sentido opuesto es levógiro. El sentido con que los monosacáridos con más de un centro quiral desvían el plano de la luz polarizada depende del conjunto de todos los centros quirales (figura 1-21).

El número de estereoisómeros de los monosacáridos depende del número de centros quirales, según la fórmula 2^n, donde la "n" es el número de centros quirales. Las cetosas tienen un centro quiral menos que las aldosas correspondientes; el número de estereoisómeros de las cetosas es siempre la mitad.

La glucosa ($C_6H_{12}O_6$) es el monosacárido más común. En la fotosíntesis las algas y las plantas producen glucosa a partir de CO_2 y agua, utilizando luz solar como fuente de energía.

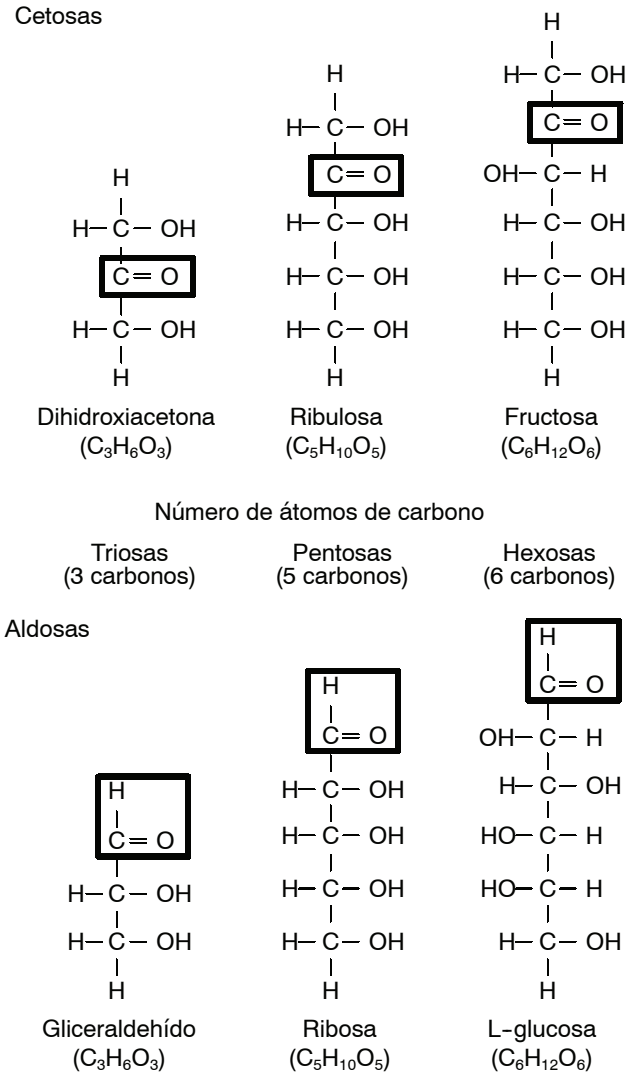


Figura 1-20. Esquema de monosacáridos de los tipos aldosa y cetosa. Se muestran ejemplos de triosas, pentosas y hexosas. Las tetrosas ($C_4H_8O_4$) de importancia biológica son la eritrosa (aldosa) y la eritrulosa (cetosa).

En la respiración celular de los seres humanos se rompen los enlaces de la molécula de glucosa, liberando la energía almacenada para que ésta pueda utilizarse en el metabolismo celular.

Otras aldohexosas de importancia biológica son la manosa y la galactosa de la leche.

La principal cetohexosa es la fructosa, que al unirse a la glucosa forma el disacárido sacarosa o azúcar de mesa.

La polimerización de la alfa-glucosa (figura 1-22) forma almidón o glucógeno en plantas o animales, respectivamente, mientras que la beta-glucosa polimerizada forma celulosa; los primeros son polisacáridos energéticos, ya que constituyen la energía de reserva. La celulosa es un polisacárido no energético, sino estructu-

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

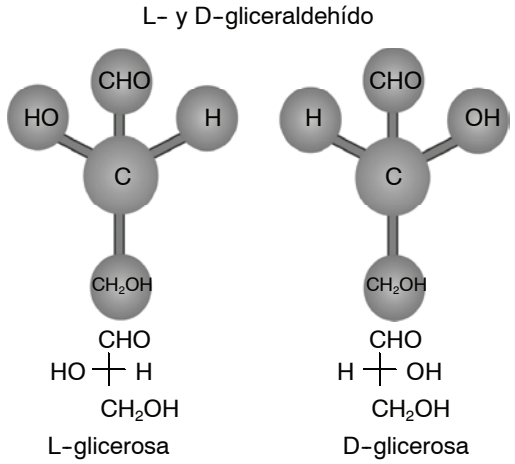


Figura 1-21. Esquema de la aldosa gliceraldehído (glicerosa), la cual contiene un solo carbono asimétrico o centro quiral.

ral, que forma la parte principal de la matriz extracelular (pared celular) de las células vegetales.

Disacáridos

Son compuestos formados por dos monosacáridos unidos mediante un enlace covalente glucosídico, que generalmente se forma entre el C_1 de una molécula y el C_4 de la otra molécula.

La maltosa (azúcar de malta) tiene dos moléculas de glucosa unidas por un enlace covalente. La lactosa (el azúcar de la leche) se compone de una molécula de glucosa y otra de galactosa.

La sacarosa es una molécula de glucosa unida a otra de fructosa. En la formación de un enlace glucosídico

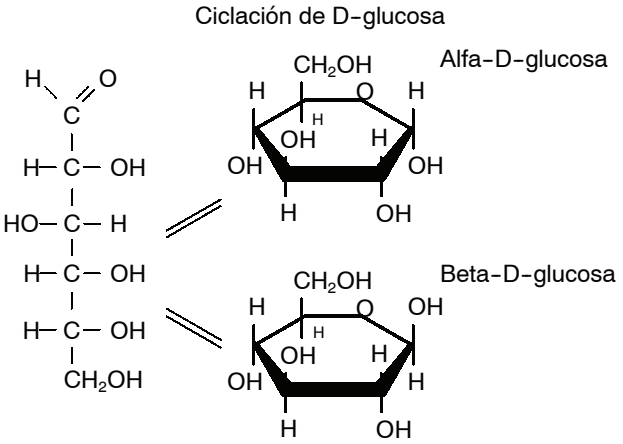


Figura 1-22. Cuando la D-glucosa forma un anillo tiene dos formas isoméricas posibles, que difieren sólo en la orientación de un grupo -OH. Obsérvese la diferencia con el isómero L-glucosa de la figura 1-20.

siempre participa al menos un hidroxilo hemiacetálico (o hemicetálico, si se trata de una cetosa) de un monosacárido y un hidroxilo alcohólico o hemiacetálico de otro. En el primer caso el disacárido es reductor, como en la maltosa, y en el segundo es no reductor, como en la sacarosa.

Polisacáridos

Son los carbohidratos más abundantes, e incluyen glucógeno, celulosas y almidones. Son macromoléculas en las que se asocian varias unidades de azúcares simples, generalmente glucosa. Aun cuando el número de unidades presentes es variable, por lo general se encuentran miles de ellas en una sola molécula de polisacárido, que puede ser una cadena simple larga o ramificada. El almidón es la forma típica en que se almacenan carbohidratos en las plantas; es un polímero de subunidades de glucosa cuyos monómeros se unen por enlaces glucosídicos. El almidón se encuentra en dos formas: amilosa y amilopectina. La amilosa es la forma más simple sin ramificaciones. La amilopectina es la forma habitual; consta de cerca de 1 000 unidades en una cadena ramificada. Las ramificaciones ocurren cada 20 o 25 unidades, y en ellas intervienen los carbonos 1 y 6 (enlaces glucosídicos). Las plantas almacenan almidón en gránulos dentro de organelos especializados, llamados plástidos. Cuando se requiere energía para el metabolismo celular, la planta somete a hidrólisis el almidón y libera subunidades de glucosa. El ser humano posee enzimas capaces de hidrolizar el almidón.

El glucógeno (almidón animal) es la forma en que se almacena la glucosa en los tejidos animales. Este polisacárido es una cadena muy ramificada que es más soluble en agua que el almidón. La glucosa no puede almacenarse como tal; sus moléculas pequeñas, sin carga y fácilmente solubles, escaparían de las células; por ello el glucógeno se almacena en hígado y células musculares.

Las células vegetales están rodeadas por una fuerte pared celular de soporte constituida principalmente por celulosa. Ésta es un polisacárido insoluble compuesto por la unión de moléculas de glucosa. Sus enlaces no se desdoblan por las enzimas que hidrolizan el almidón. Los seres humanos no tienen enzimas con las cuales digerir la celulosa y, por tanto, no pueden utilizarla como nutriente. Sin embargo, la celulosa es un componente importante de la fibra de la dieta, y coadyuva a mantener el buen funcionamiento del tracto digestivo.

Carbohidratos complejos modificados

Ciertos derivados de los monosacáridos son compuestos biológicamente importantes. En los aminoazúcares

www.elsolucionario.org

glucosamina y galactosamina el grupo amino (-NH_2) reemplaza al grupo hidroxilo (-OH). La galactosamina se encuentra en el cartílago y la glucosamina es la unidad molecular de la quitina, principal componente del esqueleto de los insectos y artrópodos, así como de las paredes celulares de los hongos.

Al integrarse a las proteínas, los carbohidratos forman glucoproteínas. La mayor parte de las proteínas secretadas por las células son glucoproteínas, y también se encuentran en la superficie externa de las membranas celulares. Al combinarse con lípidos forman glicolípidos, que participan en la interacción intercelular.

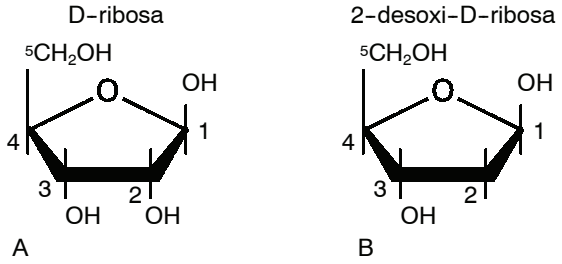


Figura 1-23. Esquema de los azúcares de cinco carbonos, que se encuentran en los ácidos nucleicos. ***A.*** La ribosa es el azúcar que se encuentra en el RNA. ***B.*** La desoxirribosa forma los nucleótidos para el DNA y carece de un átomo de oxígeno en la posición 2.

Ácidos nucleicos

Existen dos tipos: el ácido desoxirribonucleico (DNA) y el ácido ribonucleico (RNA). Son componentes principales de las células y constituyen, en conjunto, entre 5 y 15% de su peso seco. Los ácidos nucleicos también están presentes en los virus, formando complejos con proteínas que pueden infectar a una célula huésped y replicarse en su interior. Un gen es un segmento de una cadena doble de DNA, el material hereditario de las células, y contiene instrucciones para la producción de todas las proteínas que el organismo necesita. El DNA se localiza en el núcleo celular y el RNA en el citoplasma, pero se sintetiza en el núcleo. La síntesis de RNA se llama transcripción. El RNA mensajero participa en la síntesis proteica y está asociado a la transmisión de la información genética desde el núcleo hacia el citoplasma, donde tiene lugar la síntesis de proteínas, proceso al cual está estrechamente relacionado.

Existen tres tipos principales de RNA: RNA mensajero (mRNA), RNA de transferencia (tRNA) y RNA ribosómico (rRNA), que actúan en el proceso de síntesis de proteínas.

El DNA se aisló por primera vez de las células del pus y del esperma de salmón. El suizo Friedrich Miescher, en 1870, estudió el DNA a partir del núcleo de los leucocitos; su nombre se origina del hecho de que la primera vez que se identificaron se observó que eran ácidos contenidos en el núcleo celular, por lo que su primera denominación fue nucleína.

Nucleótidos

Los nucleótidos están formados por:

1. Una base nitrogenada, ya sea una purina de doble anillo o una pirimidina de anillo simple.
2. Un azúcar de cinco carbonos, que puede ser ribosa para el RNA o desoxirribosa para el DNA (figura 1-23).
3. Un grupo fosfato o ácido fosfórico ($H_3PO_4^-$).

El ácido fosfórico se une al carbono número 5' de la pentosa, mientras la base nitrogenada se une al carbono 3'. Así, los nucleótidos constan de un nucleósido (la base nitrogenada unida a la pentosa) unido a una molécula de ácido fosfórico. Los desoxirribonucleótidos son las moléculas estructurales del DNA; todos tienen como pentosa la 2'-desoxi-D-ribosa, y difieren entre sí en función de la base nitrogenada que posean, de la cual reciben el nombre.

Hay cuatro tipos de bases nitrogenadas que forman parte de los desoxirribonucleótidos: la adenina, la guanina (ambas derivados de la purina), la citosina y la timina (estas últimas derivadas de la pirimidina). Se forman desoxirribonucleótidos de adenina, guanina, citosina y timina.

El DNA contiene las bases púricas adenina (A) y guanina (G) y las bases pirimídicas citosina (C) y timina (T), junto con el azúcar desoxirribosa y el fosfato, mientras que en el RNA el uracilo (U) reemplaza a la timina (figura 1-24).

Los ribonucleótidos son las moléculas estructurales del RNA. De modo semejante a los desoxirribonucleótidos, constan de una molécula de ácido fosfórico, una molécula de pentosa, en este caso la D-ribosa, y una base nitrogenada, que puede ser de cuatro tipos: adenina, guanina, citosina y uracilo.

Los nucleótidos se unen entre sí por enlaces covalentes entre el ácido fosfórico de un nucleótido y el carbono en posición 3' de la molécula de pentosa de otro nucleótido (enlace fosfodiéster), formando así la estructura covalente de las cadenas de ácidos nucleicos (figura 1-25).

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

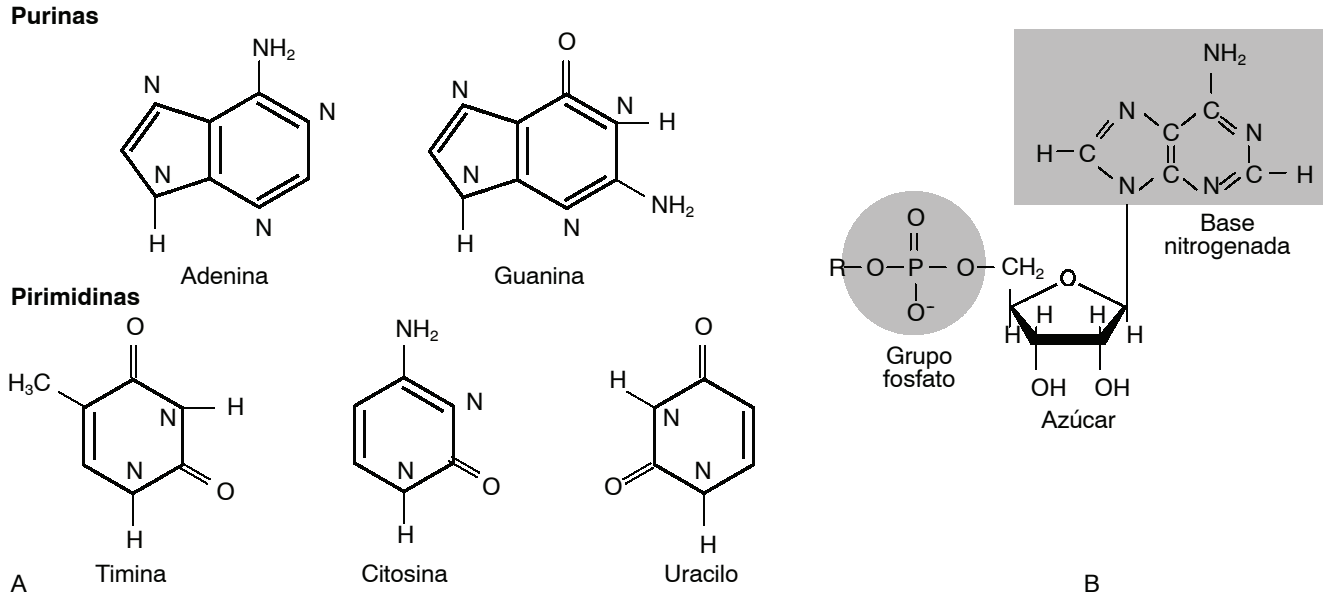


Figura 1-24. ***A.*** Esquema de las bases nitrogenadas púricas y pirimídicas. ***B.*** Esquema de la estructura de los nucleótidos formados por un fosfato, un azúcar y una base nitrogenada.

Ácido desoxirribonucleico (DNA)

En humanos la doble cadena del DNA mide casi 2 m de longitud en cada núcleo celular haploide. El modelo que conocemos del DNA en forma de espiral bicatenaria o de doble hélice fue dilucidado por medio de la difracción de rayos X por el físico Francis Crick y el biólogo James Watson en Cambridge, Inglaterra, en 1953. Por este trabajo recibieron el premio Nobel de Medicina en 1956. Un giro completo de la doble hélice contiene 10 pares de bases (pb) unidas en forma perpendicular a la columna de pentosas. Existen 0.34 nm de separación entre cada monómero, y 3.4 nm en un giro completo. La doble hélice tiene un diámetro de 2.0 nm, aproximadamente.

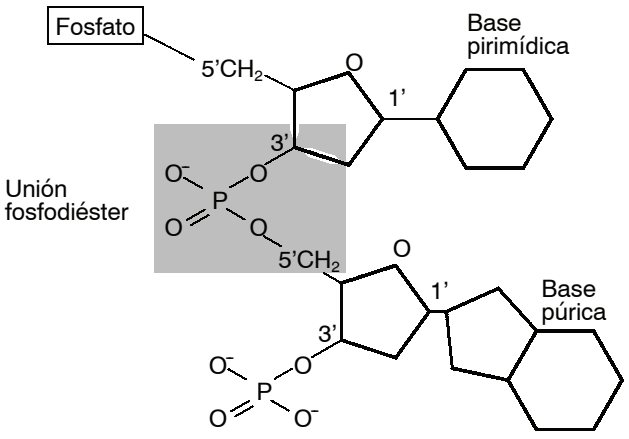


Figura 1-25. Esquema del enlace fosfodiéster. El ácido fosfórico está unido por una unión éster fosfato al azúcar del nucleótido y por otra unión equivalente al azúcar del nucleótido que le precede.

Las cadenas sencillas son antiparalelas, y una secuencia de bases siempre debe ser complementaria a la de enfrente. Durante la replicación se separan las dos hebras, y cada una forma una nueva pareja.

En la doble hélice las bases se encuentran situadas en el interior de la molécula y los grupos fosfato se disponen en el exterior. Las bases nitrogenadas se unen siempre del mismo modo (adenina con timina y citosina con guanina) por medio de puentes de hidrógeno (figura 1-26).

La estructura se mantiene estable gracias al apilamiento de las bases en el centro de la molécula. Las dos hebras se pueden separar por medio de calor o de determinadas sustancias químicas como la urea y la formamida, dando lugar al proceso reversible llamado desnaturalización, el cual permite recuperar la estructura helicoidal (renaturalización). La temperatura a la que la molécula de DNA se desnaturaliza depende de la secuencia de bases (de 55 a 65 °C en promedio).

El DNA contiene toda la información genética de los seres vivos en las secuencias llamadas genes, los cuales pueden codificar para una proteína. El DNA se encuentra en el núcleo de la célula empaquetado a distintos niveles, formando los cromosomas, aunque también forma parte de organelos celulares, como mitocondrias en animales y cloroplastos en vegetales.

www.elsolucionario.org

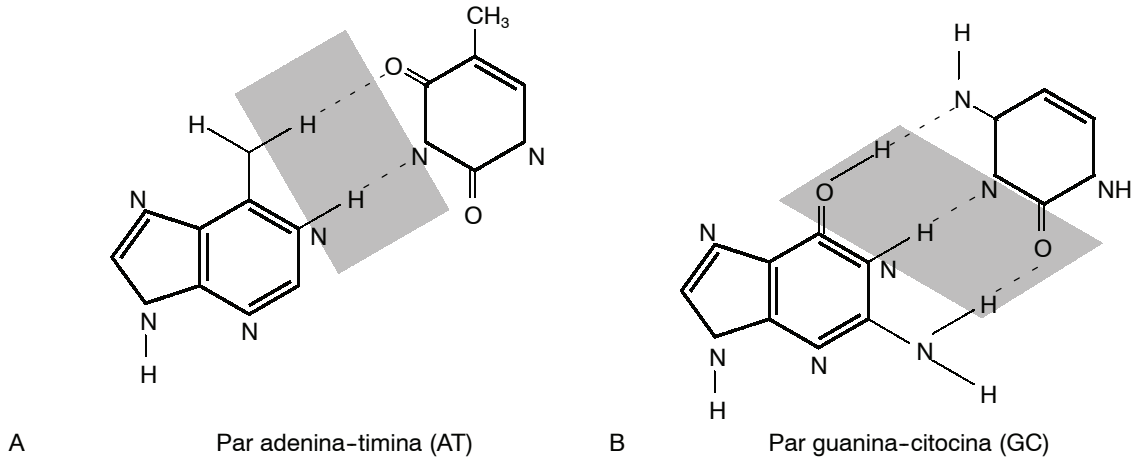


Figura 1–26. Esquema de la alineación de las bases, que se mantienen unidas por puentes de hidrógeno. En todos los casos, una base púrica más grande se une con una base pirimídica de menor tamaño. ***A.*** La adenina siempre se une con la timina por medio de dos puentes de hidrógeno. En el RNA, la adenina se aparea con el uracilo. ***B.*** La guanina siempre se une con la citosina por medio de tres puentes de hidrógeno.

Las moléculas de DNA son más largas que las de RNA, además de que poseen una estructura doble (figura 1–27). Debido a su elevado contenido en ácido fosfórico y a su pH cercano a la neutralidad del medio celular, las moléculas de DNA poseen carga negativa. Esto favorece su asociación con proteínas básicas (histonas), que en conjunto con el DNA constituyen la cromatina nuclear (*cromatos* = color). El DNA (y las histonas asociadas) se dispone en forma helicoidal y parcialmente enrollado mientras la célula está en actividad normal, pero sufre una gran condensación (superenrrollamiento) en el momento de la división celular, formando cromosomas.

Las diferencias estructurales entre la cromatina nuclear de la interfase y los cromosomas de la metafase se deben a que tienen diferentes grados de condensación en la molécula de DNA.

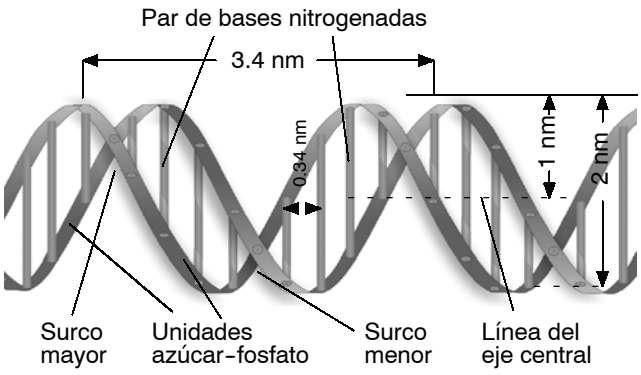


Figura 1–27. Modelo del DNA en forma de espiral bicatenaria o de doble hélice propuesto por Watson y Crick en 1953.

Ácido ribonucleico (RNA)

El RNA está constituido por una cadena única y sus dimensiones son más reducidas que las del DNA. Los tres tipos principales de RNA (mensajero, de transferencia y ribosómico) están relacionados con el proceso de síntesis de proteínas, que tiene lugar en los ribosomas. El mRNA contiene la información de la secuencia de aminoácidos de una proteína y la obtiene mediante el proceso de transcripción, a través del cual una enzima RNA polimerasa copia la información contenida en un gen de una de las dos cadenas del DNA.

Este proceso ocurre en el núcleo, pero el mRNA se transloca al citoplasma a través de los poros nucleares para llegar a los ribosomas.

La secuencia de bases del mRNA complementaria al gen del cual se transcribió contiene la información sobre la posición que deben ocupar los aminoácidos en la proteína.

Esta codificación se denomina código genético. Los diferentes tRNA son los encargados de reconocer a cada uno de los aminoácidos y ubicarlos en el lugar señalado por el código genético en un proceso de síntesis proteica denominado traducción. Existe un tRNA para cada aminoácido.

Otros nucleótidos de importancia biológica

El trifosfato de adenosina (ATP), compuesto de adenina, ribosa y tres fosfatos, proporciona energía a las células. Los dos fosfatos terminales se unen al nucleótido mediante enlaces de alta energía, que se señalan por el símbolo ~P.

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

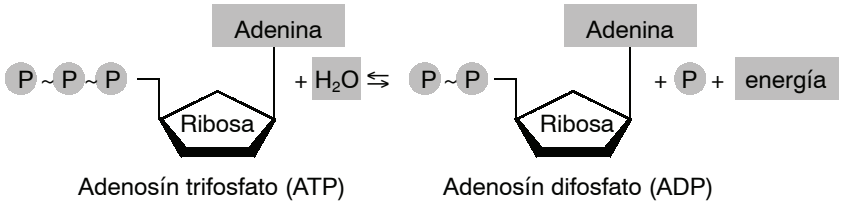


Figura 1-28. El adenosín trifosfato (ATP) es un nucleótido de suma importancia biológica. Debido a que los fosfatos son muy ricos en energía, se les considera la moneda energética de las células.

Estos enlaces reciben ese nombre porque liberan una gran cantidad de energía cuando se someten a hidrólisis. La energía química que se libera es biológicamente utilizable y se transfiere a otras moléculas.

La mayor parte de la energía química de las células se almacena en enlaces de fosfato (ATP) ricos en energía, lista para liberarse cuando el grupo fosfato se transfiere a otra molécula.

Por otro lado, los nucleótidos pueden ser convertidos en una forma cíclica por medio de las enzimas denominadas ciclasas.

De esta forma la adenilatociclasa convierte al ATP en adenosín monofosfato cíclico (AMPc). Los nucleótidos cíclicos median los efectos hormonales y regulan algunas funciones celulares actuando como segundos mensajeros; éstos son el AMPc y el GMPc (guanosín monofosfato cíclico), que proviene del GTP por acción de la guanilatociclasa.

El dinucleótido de adenina y nicotinamida (NAD) actúa como receptor y donador de hidrógeno y electrones en las reacciones de oxidación y reducción que se producen en las células.

El ATP es un nucleótido de suma importancia que se conoce como la "moneda energética" de la célula, ya que los enlaces entre los fosfatos son muy ricos en energía, y al romperse permite la formación de adenosín difosfato (ADP) más fosfato (P) más energía, como se muestra en la figura 1-28.

De igual forma, si un proceso metabólico como la glucólisis libera energía, ésta es captada en forma de ATP para su utilización posterior.

RENOVACIÓN CELULAR

Las células somáticas del humano se pueden clasificar de acuerdo con su actividad mitótica, la cual puede determinarse por la cantidad de metafases visibles en un solo campo de gran aumento (100 X) del microscopio óptico. Las diversas poblaciones celulares se clasifican de la siguiente manera:

1. **Poblaciones celulares estáticas.** Son las células que se encuentran en estado de reposo G_0 y, por lo tanto, son células que ya no se dividen, como las neuronas.
2. **Poblaciones celulares estables.** Son células que se dividen de manera episódica y con lentitud para mantener la estructura normal de los tejidos, como las células endoteliales.
3. **Poblaciones celulares renovables.** A su vez se clasifican en células de renovación lenta o rápida, pero tienen actividad mitótica regular.
   a. **Poblaciones de renovación lenta.** En esta clasificación se ubican los fibroblastos de la pared uterina, las células epiteliales del cristalino y las células musculares lisas de la mayoría de los órganos huecos, entre otras.
   b. **Poblaciones de renovación rápida.** En este rubro se identifican los fibroblastos dérmicos y los fibroblastos subepiteliales del revestimiento mucoso del tubo digestivo, las células epiteliales, las células sanguíneas, etc.

www.elsolucionario.org

Capítulo 2

Evolución y diversidad de los seres vivos

Dolores Javier Sánchez González, Nayeli Isabel Trejo Bahena

EVOLUCIÓN

La teoría de la evolución se ha convertido en un concepto unificador sólido en biología. Charles Darwin fue el primero en plantear un mecanismo lógico para explicarla. En su libro acerca del origen de las especies por medio de la selección natural (*On the origin of species by means of natural selection*), publicado en 1859, Darwin presentó algunas pruebas que demuestran que la forma actual de vida en la Tierra desciende, con modificaciones, de formas de vida primitiva. Darwin desarrolló en 1838 el concepto de selección natural, una variación heredable en eficacia, en el que plantea que los organismos que sobreviven son los que se encuentran más favorecidos por ser portadores de algunas variaciones genéticas ventajosas, lo que ocasiona un estado de mayor supervivencia y reproducción con respecto a los no favorecidos de la misma especie, que tienden a ser desplazados hasta la extinción, sobreviviendo sólo los más fuertes, hábiles, inteligentes, mejor adaptados, etc. Charles Darwin basó su teoría de la selección natural en las siguientes observaciones:

1. Los organismos de una misma especie que pueden encontrar más y mejor alimento, así como un entorno más favorable, pueden tener ventajas de supervivencia con respecto a sus congéneres menos favorecidos.
2. Los miembros individuales de una misma especie tienen entre sí algunas variaciones fenotípicas (en su aspecto) y genotípicas (en su genoma, aunque esto Darwin no lo sabía).
3. Con base en los puntos anteriores se desarrolla una lucha por la supervivencia entre los diferentes individuos de la misma especie. Los individuos que poseen características de ventajas en la lucha por la supervivencia tendrán más posibilidades de vivir que aquéllos que carecen de dichas características.
4. Los que sobreviven, que por lógica son los más fuertes y mejor adaptados al medio ambiente, transmiten a sus descendientes las características que les dan ventaja sobre otras especies.

"A esta conservación de las variaciones y diferencias individualmente favorables y a la destrucción de las que son perjudiciales, la he llamado selección natural o supervivencia de los más aptos": Charles Darwin.

Los principios de la selección natural son los siguientes:

1. Principio de la herencia.
2. Principio de la variación.
3. Principio de la eficacia diferencial.

Además, la selección natural puede presentarse por dos mecanismos:

1. Selección adaptativa.
2. Selección indirecta o correlacionada.

Actualmente se sabe que las diferencias intraespecie son el resultado de una diferente composición genética entre sí, como polimorfismo genético y diferente dotación de genes, así como diferencias en su expresión, que puede ser dominante o recesiva. Las mutaciones fortuitas que originan cambios permanentes en los genes son los procesos que proveen el motor para la evolución.

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

"Nada tiene sentido en biología si no es a la luz de la evolución": Theodosius Dobzhansky (1900–1975).

Evolución celular

Las evidencias científicas sugieren que todos los seres vivos sobre la Tierra proceden de una única célula primitiva, nacida por agregación espontánea de moléculas hace aproximadamente 3 500 millones de años, en un proceso dividido en cuatro etapas:

1. Se formaron polímeros de RNA capaces de autorreplicarse (ribozimas) a través de interacciones de apareamiento de bases complementarias (figura 2-1).
2. Se desarrollaron mecanismos de síntesis proteica dirigida por RNA.
3. Se ensambló una membrana lipídica que recubrió la mezcla autorreplicante de RNA y proteínas.
4. Se formó la célula ancestral (protocélula).

Los experimentos de Harold Urey y Stanley Miller en 1950 demostraron la hipótesis del ruso A. I. Oparin y el escocés J. B. S. Haldane, quienes en 1920 propusieron que las biomoléculas pueden formarse de manera espontánea a partir de materia prima. Miller y Urey demostraron que los aminoácidos pueden originarse a partir de reacciones y procesos de síntesis causados por descargas eléctricas o radiación ultravioleta en mezclas de metano (CH_4), amoniaco (NH_3), hidrógeno (H_2) y agua (H_2O). Los gases reaccionaban formando pequeñas moléculas orgánicas tales como cianuro de hidrógeno (HCN) y formaldehído (H_2CO), los que en solución acuosa generaron las cuatro clases principales de pequeñas moléculas orgánicas encontradas en las células: aminoácidos, nucleótidos, azúcares y ácidos grasos. Los procesos autocatalíticos se observan en el ciclo vital de algunos virus que, después de ingresar en las células, dirigen la síntesis de proteínas que cataliza selectivamente su propia replicación. Esta primera célula hipotética debió ser muy parecida a los micoplasmas, los cuales son microorganismos parecidos a bacterias, pero sin pared celular, por lo que tienen una vida parasitaria estricta en el interior de otras células. Su diámetro mide 0.3 μm y codifican la síntesis de cerca de 750 proteínas diferentes, que es el número mínimo de proteínas que una célula necesita para sobrevivir, lo cual se asemeja a la cantidad de 700 proteínas en las mitocondrias.

Las bacterias que se dividen cada 20 minutos, como la *E. coli,* pueden formar más de 6 000 millones de células en menos de 12 horas (el mismo número de la población humana mundial actual). Esta rápida capacidad de división les permite adaptarse rápidamente a su entorno. Existen dos grupos diferentes de bacterias: las eubacterias, que son las formas más comunes, y las arqueobacterias, que se encuentran en ambientes extremos de temperatura (fríos intensos como los hielos polares y calor como el volcánico, acidez, ausencia total de oxígeno, etc.), por lo cual comparten las características de adaptación que pudo haber tenido la primera célula ancestral (cuadro 2-1).

Las células eucariotas más complejas conocidas se encuentran en el reino *Protista* de los protozoos. Éstos son eucariotas unicelulares de vida libre que tienen una gran variedad de formas y comportamientos distintos:

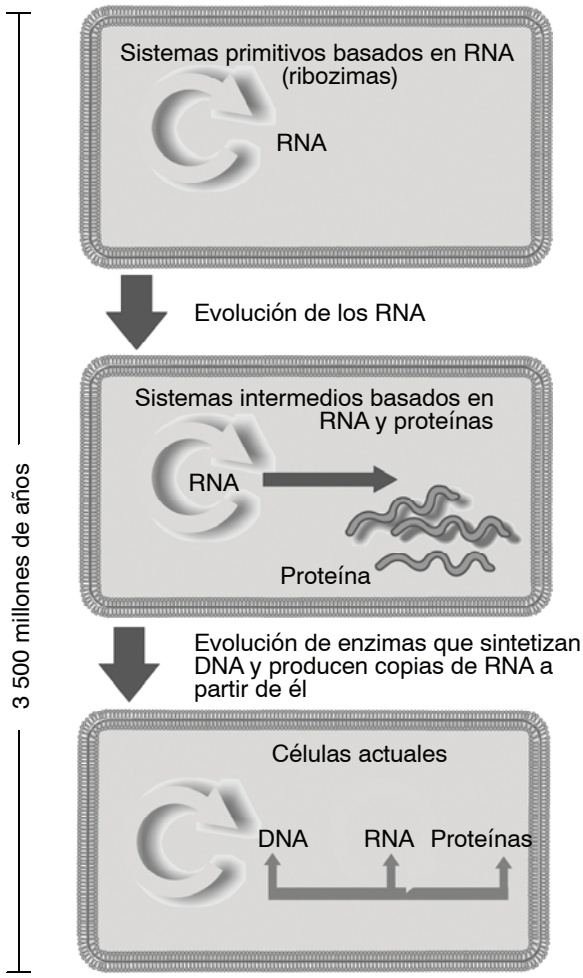


Figura 2-1. Representación esquemática de las etapas evolutivas de las células. Primero se formaron polímeros de RNA capaces de autorreplicarse (ribozimas), posteriormente se desarrollaron mecanismos de síntesis proteica dirigida por RNA. En la etapa final, el DNA reemplazó al RNA como portador de la información genética, ya que es más estable y resistente a la destrucción.

www.elsolucionario.org

Cuadro 2-1. Historia resumida de la vida en la Tierra

Era	Periodo	Época	Eventos	Tiempo
	Precámbrico		Formación de la Tierra	4 500 m. a.
			Nacimiento de la primera célula ancestral universal	3 500 m. a.
			Surgimiento de la célula eucariota	1 500 m. a.
			Surge la reproducción sexual	1 000 m. a.
Paleozoica	Cámbrico		Surgimiento de los organismos pluricelulares (invertebrados)	570 m. a.
	Ordovícico		Surgen los vertebrados (peces)	500 m. a.
	Silúrico		Las plantas y artrópodos invaden la Tierra	450 m. a.
	Devónico		Surgen los anfibios	410 m. a.
	Carbonífero		Surgen los reptiles y los tiburones antiguos	360 m. a.
	Pérmico		Surgen los insectos modernos	290 m. a.
	Triásico		Surgen los mamíferos y los dinosaurios	250 m. a.
Mesozoica	Jurásico		Surgen las aves con dientes	215 m. a.
	Cretácico		Se extinguen los dinosaurios	150 m. a.
		Paleoceno	Los mamíferos se diversifican con rapidez	65 m. a.
		Eoceno	Surgen órdenes modernos de aves y mamíferos	55 m. a.
	Terciario	Oligoceno	Surgen todas las familias actuales de mamíferos, incluyendo a los simios	30 a 40 m. a.
Cenozoica		Mioceno	Surgen los ancestros directos de los homínidos (*Driopitecinos*)	25 m. a.
		Plioceno	Surgen los primeros homínidos	5 a 8 m. a.
	Cuaternario	Pleistoceno	El género *Homo* divergió del género *Australopithecus*	2 a 2.5 m. a.
		Holoceno	Surge el *H. neanderthalensis**	150 000 años
			Surge el *H. sapiens* (hombre moderno)	150 000 años

* Se extinguió hace 30 000 años. m. a.: millones de años. El hombre surgió hace apenas 150 000 años, y en tan poco tiempo de existencia estamos destruyendo la Tierra a una velocidad vertiginosa. ¿Valdrán la pena los avances tecnológicos y las comodidades actuales si ponemos en riesgo el futuro de nuestra descendencia y de la naturaleza?

pueden ser móviles o sedentarios, fotosintetizadores o carnívoros.

Su morfología es compleja e incluye estructuras como fibras sensoriales, fotorreceptores, flagelos, apéndices o seudópodos a modo de patas, partes bucales, flechas urticantes y haces contráctiles parecidos a músculos. Aunque son unicelulares, son igual o más complicados y versátiles que muchos organismos pluricelulares.

Para la evolución eucariota no es suficiente la gran complejidad de una sola célula, sino la distribución de funciones y trabajo entre diferentes tipos de células, por lo cual se formaron los organismos pluricelulares, en los que sus células se diferenciaron unas de otras, desarrollando características funcionales distintivas. Esta especialización no depende de la pérdida o adquisición de genes, sino de diferencias en la expresión génica, o sea que ciertos genes se expresan en algunas células y otros lo hacen en otras, o se expresan de manera diferente, a pesar de que todas las células de un organismo pluricelular contienen el mismo genoma.

Origen de los eucariotas

Las evidencias sugieren que las células eucariotas evolucionaron a partir de sus ancestros procarióticos. Las células eucarióticas tienen 1 000 veces más volumen y su material genético es más organizado.

En este contexto, se supone que las mitocondrias y los cloroplastos descienden de bacterias endosimbiontes (raíces griegas que significan "vivir juntos dentro") que fueron adoptadas por algunas células hospederas ancestrales. Las bacterias endosimbiontes pudieron haber sido originalmente fagocitadas. Generalmente los procariotas fagocitados son muertos y digeridos; a veces escapan y destruyen a sus captores, pero también se da el caso de que los dos sobreviven en estado de mutua tolerancia, lo que puede originar una mutua dependencia. De esta manera, las mitocondrias y los cloroplastos bien pudieron seguir la ruta anteriormente descrita.

La zoóloga estadounidense Lynn Margulis, en 1967, propuso en su teoría endosimbiótica o de simbiogénesis que las células eucariotas se originaron a partir de una primitiva célula procariota que perdió su pared celular, lo que le permitió aumentar de tamaño. Esta primitiva célula, denominada urcariota, en un determinado momento englobaría una célula procariota, estableciéndose entre ambas una relación endosimbionte (figura 2-2).

El origen del núcleo también puede explicarse como resultado de la internalización de una parte de la membrana externa.

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

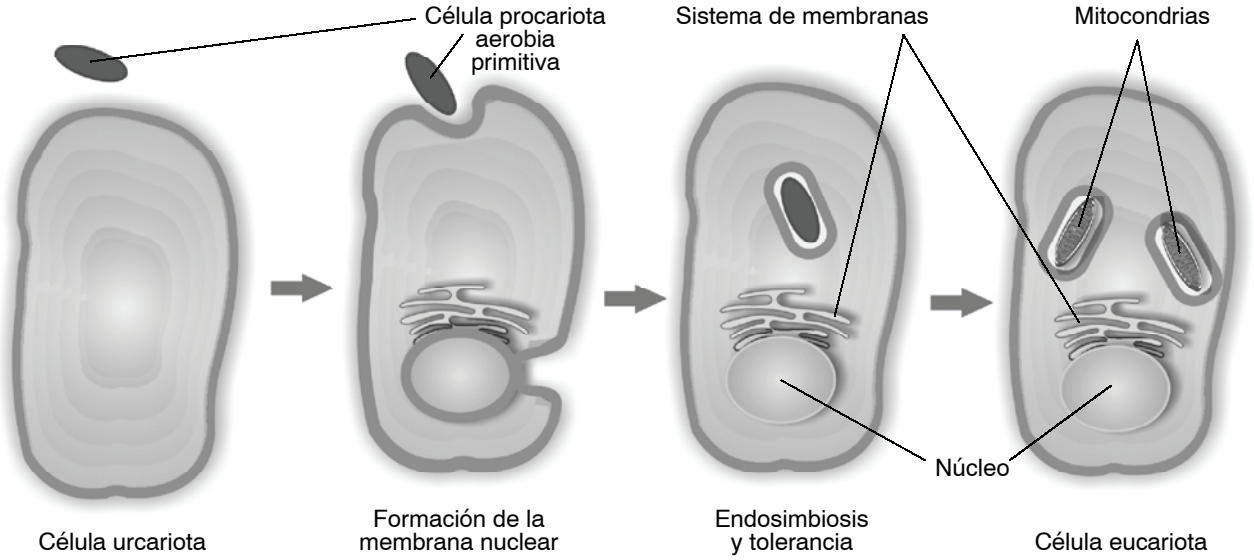


Figura 2-2. Esquema de la formación de las células eucariotas. La primitiva célula urcariota en un determinado momento fagocitó una célula procariota más primitiva que formaría las mitocondrias y cloroplastos, estableciéndose entre ambas una relación endosimbionte.

En los procariotas el cromosoma circular que contiene al DNA está anclado a la membrana celular; por lo tanto, el plegamiento interno de una parte de la membrana celular podría haber desarrollado un saco intracelular conteniendo al cromosoma.

Se le ha llamado el árbol de la vida al esquema que se forma cuando se estudia la evolución a partir de la célula ancestral universal que surgió hace 3 500 millones de años (figura 2-3).

Evolución del ser humano

Los mamíferos surgieron a partir de un grupo de reptiles primitivos hace aproximadamente 250 millones de años, y coexistieron con los dinosaurios casi 130 millones de años. La evolución de los primates (un orden de mamíferos) surgió cuando un grupo de pequeños mamíferos, semejantes a musarañas, trepó a los árboles. La presión selectiva originada en el hábitat arbóreo ocasionó un incremento de la agudeza visual, reducción de la función del olfato (sentido más importante de la mayoría de los mamíferos), la postura erecta con cambio en la orientación de la cabeza y la función prensil del dedo pulgar.

Lucy, un esqueleto fósil bien conservado de hace 3.2 millones de años, fue descubierta por Donald Johanson en 1974 en Etiopía, en el triángulo de Afar, y pertenecía a la especie *Australopithecus afarensis*.

Los dos grupos actuales de primates son los antropoides o primates superiores, como los monos, antropomorfos y humanos, y los prosimios, como los lémures. Los primeros miembros del grupo de los homínidos fueron los australopitecinos, que se originaron hace cinco millones de años; sus especies eran el *A. anamensis* y el *A. afarensis*, que conformaron el tronco ancestral, y dos linajes divergentes:

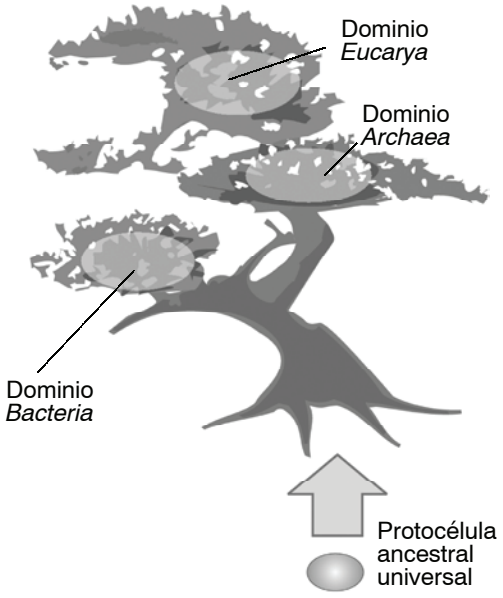


Figura 2-3. Esquema del árbol de la vida simplificado donde se muestran los tres dominios de la vida que integran a los seres vivos actuales y su evolución a partir de una célula ancestral universal. La protocélula se representa como una semilla plantada por "manos misteriosas" en la Tierra, que germinó hasta poblarla con las más variadas formas de vida imaginables, y que puede explicar todas las teorías de la creación formuladas a la fecha si se quiere ver con "ojos abiertos".

www.elsolucionario.org

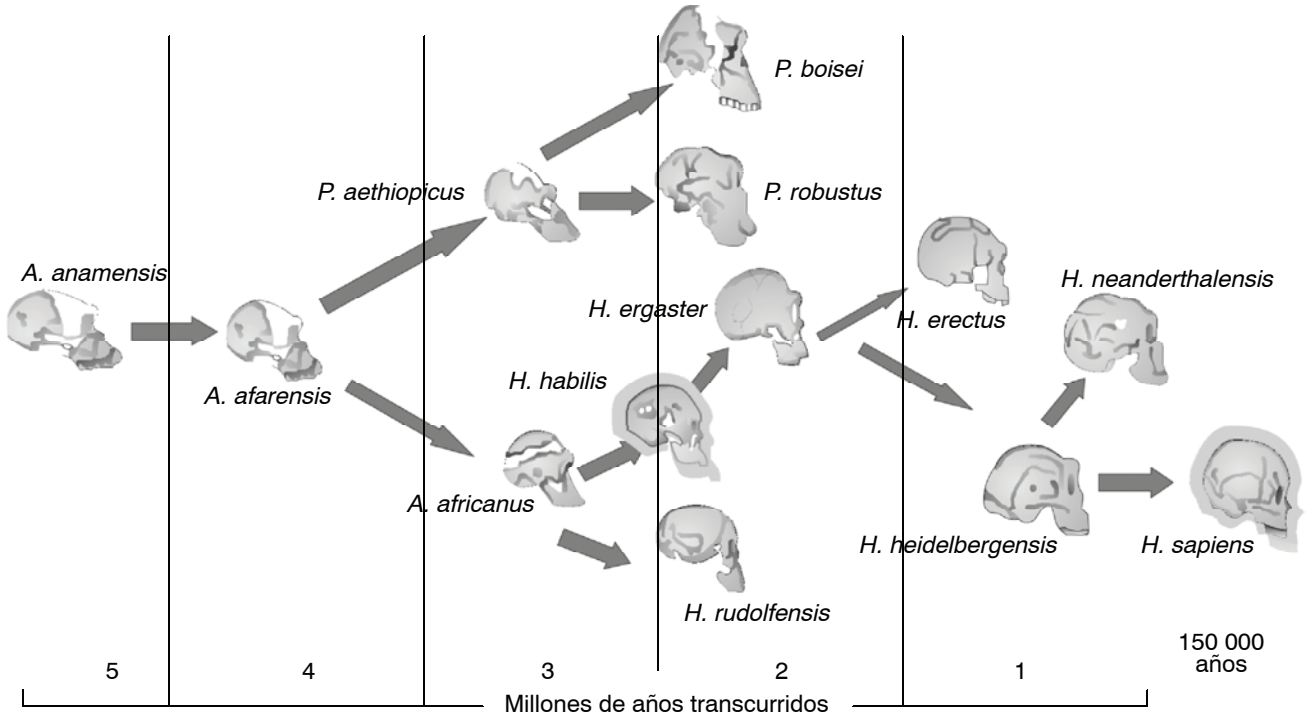


Figura 2-4. Esquema de la evolución del hombre. Se muestra la divergencia evolutiva a partir de *Australopithecus anamensis y Australopithecus afarensis.* La primera especie representante del género *Homo* es *H. habilis*, primer constructor de herramientas, que apareció hace dos millones de años.

1. *Australopitecinos gracilis*, como *A. africanus.*
2. *Australopitecinos robustus*, como *A. robustus*, *A. boisei* y *A. aethiopicus*. Los *Australopitecinos robustus* se han reasignado al género *Paranthropus*.

La primera especie representante del género *Homo* es *H. habilis*, primer constructor de herramientas, que apareció hace dos millones de años. La especie posterior, *H. erectus*, surgió hace 1.6 millones de años. Los *Homo erectus*, *Homo habilis* y *Homo sapiens* tienen características comunes, como bipedestación, postura erecta, cerebro grande, premolares bicúspides y capacidad para construir herramientas.

Según los análisis genéticos, se cree que los humanos modernos evolucionaron de una población africana que migró hace 100 000 años y que reemplazó a las poblaciones europeas y asiáticas del género *Homo* establecidas con anterioridad (figura 2-4). Análisis sobre el DNA mitocondrial (mtDNA) humano sugieren que la humanidad desciende de una mujer que vivió en África entre 140 000 y 200 000 años atrás (*Eva mitocondrial*).

A pesar de que el cuerpo humano contiene más de 75 billones de células entrelazadas morfológica y funcionalmente, sus células realizan todas las funciones necesarias para existir de manera independiente, como se demuestra cuando las células humanas pueden desarrollarse *in vitro* en cultivos celulares.

Líneas principales de la evolución de los primates

Los antropomorfos y humanos (*Homo sapiens*) forman a su vez el grupo de los hominoides emparentados con los monos del Viejo Mundo, con los cuales forman el grupo de los catarrinos. Los antropomorfos actuales conforman cuatro géneros: *Pongo* (orangutanes), *Pan* (chimpancés), *Gorilla* (gorilas) e *Hylobates* (gibones). Estos seres constituyen nuestros parientes vivos más cercanos del reino animal. La evidente homología entre estos simios y nuestra especie demuestra de manera contundente que compartimos con ellos un ancestro común más reciente que con los demás primates actuales.

Los humanos, junto con los gorilas, orangutanes y chimpancés, conforman la familia *Hominidae*, con las subfamilias de los orangutanes (*Ponginae*) y de los gorilas, chimpancés y humanos (*Hominidae*) (figura 2-5).

Evidencias del proceso evolutivo

La microevolución es el cambio en pequeña escala que ocurre dentro de las poblaciones. Un ejemplo clásico de

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

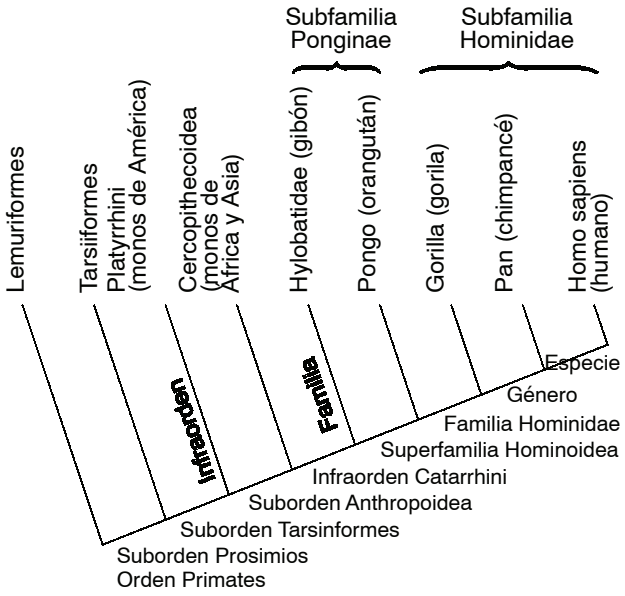


Figura 2-5. El origen de los homínidos. La separación entre los linajes de humanos y chimpancés (*Pan troglodytes*) fue hace cinco millones de años, y la divergencia entre el linaje de gorila y el de humanos-chimpancés se realizó tres millones de años antes.

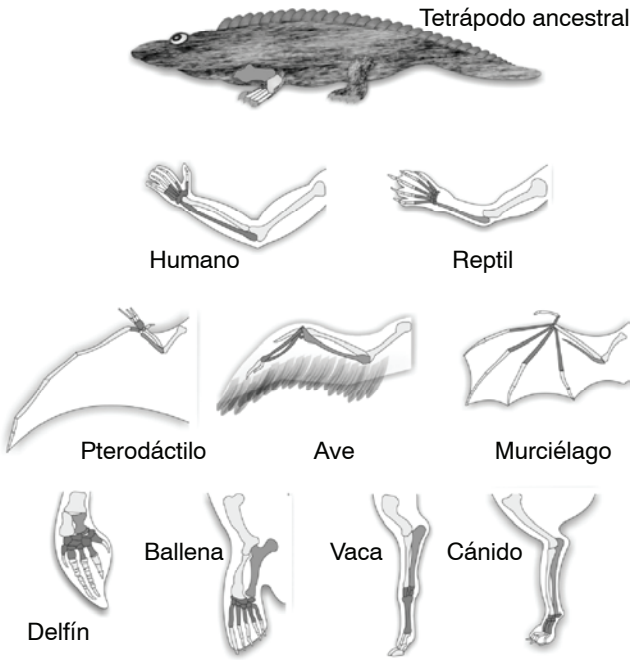


Figura 2-6. Esquema de la extraordinaria homología en el esqueleto de los vertebrados. Se muestran los huesos de las extremidades superiores o sus equivalentes. Todos los vertebrados terrestres, incluido el hombre, descienden de un vertebrado tetrápodo ancestral. Los mamíferos marinos, como los delfines y las ballenas, regresaron al mar de donde habían salido (los cordados surgieron en el mar) hace 50 a 60 millones de años, después de haber vivido como animales terrestres llamados mesoníquidos, de los cuales derivan también las jirafas, los ciervos y los antílopes.

la selección natural se observa en el incremento de bacterias resistentes a antibióticos. Las colonias bacterianas se siembran en una caja de Petri que contiene agar con el antibiótico penicilina; sólo las bacterias resistentes a la penicilina crecerán en la placa que contiene el antibiótico y las sensibles al antibiótico perecerán. Sin embargo, las evidencias del cambio evolutivo en la macroevolución (proceso que ocurre por encima del nivel de las especies a gran escala) provienen de la biogeografía, donde se observa que tipos particulares de organismos se encuentran en áreas geográficas específicas, pero no en otras áreas de clima y topografía similares. Otras evidencias en la macroevolución se observan en los registros fósiles, que muestran que los organismos han cambiado en el curso del tiempo. Estos registros fósiles muestran una sucesión de patrones morfológicos en la que las formas más simples preceden a las complejas. Además, la secuencia de aparición de ciertas especies permite deducir un orden evolutivo: los invertebrados antes que los vertebrados y, dentro de estos últimos, primero los peces, luego los anfibios y reptiles y, por último, aves y mamíferos (figura 2-6).

Evolución molecular

En la evolución molecular se pueden comparar moléculas homólogas. Las homologías entre las moléculas, estructuras, patrones de desarrollo y la unidad bioquímica en los reinos de la vida demuestran una ascendencia común; tal es el caso de las familias de ciertos genes que se estudiarán más adelante, como la superfamilia de los genes de globina, que derivan de un gen ancestral común que surgió hace 800 millones de años (figura 2-7).

NIVELES DE ORGANIZACIÓN EN BIOLOGÍA

Todos los organismos animales y vegetales superiores e inferiores están formados por células; la formulación de un principio fundamental de la biología que se conoce como teoría celular se puede resumir diciendo que la célula es la unidad morfológica y funcional de un ser vivo.

Las células eucariotas integran organismos tanto unicelulares como pluricelulares a partir de los protozoos. Existe un mundo microscópico constituido por las células procariotas sin núcleo verdadero; por debajo de este nivel de organización están los virus y viroides (com-

www.elsolucionario.org

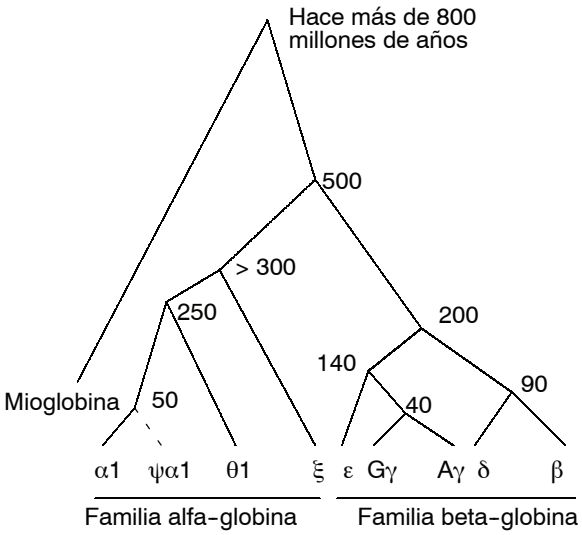


Figura 2-7. Esquema del árbol evolutivo de los genes humanos de globina. Las líneas punteadas señalan seudogenes (genes inactivos o defectuosos que no se expresan). Se muestra el desglose de las familias de los genes alfa y beta.

puestos de RNA desnudo autocatalítico no codificante), que ni siquiera pueden ser considerados seres vivos, al igual que los priones (ver más adelante).

Clasificación de los seres vivos

Los seres vivos se pueden clasificar según el número de células en:

1. **Seres vivos unicelulares:** están formados por una sola célula que funciona y sobrevive de manera independiente de otras células.
2. **Colonias celulares:** son un conjunto de múltiples células similares que se agrupan para vivir juntas, cooperando entre ellas, pero manteniendo la individualidad.
3. **Seres vivos pluricelulares:** están formados por miles o millones de células que se especializan para vivir juntas sin capacidad para sobrevivir de forma independiente, de tal manera que todas juntas forman un ser vivo; sin embargo, todas ellas proceden, por división, de una única célula inicial. En los organismos pluricelulares, las células se especializan o diferencian formando tejidos, órganos, sistemas y aparatos. El ser humano es un organismo pluricelular formado por 250 tipos de células o estirpes celulares.

Por la forma en que obtienen su fuente de alimentos y energía, los seres vivos se clasifican en:

1. **Heterótrofos.** Son organismos que dependen de una fuente exterior de moléculas orgánicas.
2. **Autótrofos.** Son organismos que pueden fabricar sus propios nutrimentos orgánicos.

Los organismos vivos se clasifican en cinco reinos: *Monera*, *Protista*, *Fungi*, *Plantae* y *Animalia*.

Según la complejidad estructural, los seres vivos se pueden clasificar también en:

1. **Procariotas.** Estructuralmente son muy simples, sólo se encuentran formando seres unicelulares o colonias. Las células procariotas forman los dominios *Archaea* y *Eubacteria* del reino Monera.
2. **Eucariotas.** Estos organismos contienen organelos rodeados de membranas y forman el dominio Eukarya. Existen organismos eucariotas unicelulares, pero también existen muchos eucariotas formando colonias y organismos multicelulares. El reino eucariota unicelular se refiere a los protozoarios como las amebas. Los reinos pluricelulares eucariotas son: *Animalia*, *Plantae* y *Fungi.*

Células procariotas y eucariotas

La vida sobre la Tierra se divide en dos grandes grupos, según la estructura y complejidad de sus células: los organismos eucariotas y procariotas (términos acuñados por Edouard Chatton en 1937). Los organismos eucariotas son aquéllos que contienen núcleo limitado por membrana. El núcleo sirve para almacenar el material genético, o DNA. Las células de procariotas (antes del núcleo) carecen de núcleo y generalmente son más pequeñas que las eucariotas.

El DNA de las células procariotas está confinado a una o más regiones seudonucleares, que se denominan nucleoides no limitados por membrana.

En algunas células procariotas la membrana plasmática puede plegarse hacia adentro y forma un complejo de membranas internas en donde se llevan a cabo las reacciones de transformación de energía, similar a lo que ocurre en la mitocondria. Las células procariotas también tienen una pared celular o membrana externa.

Las células eucariotas tienen varios organelos limitados por membranas que dividen el citoplasma celular en varios compartimientos adicionales (figura 2-8).

Las células eucariotas tienen gran cantidad de DNA codificante y no codificante, por lo que su RNA debe sufrir corte y empalme (*splicing*) en el citoplasma para eliminar sus intrones (secuencias no codificantes) (figura 2-9). Sus genes por lo general son monocistrónicos, es

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

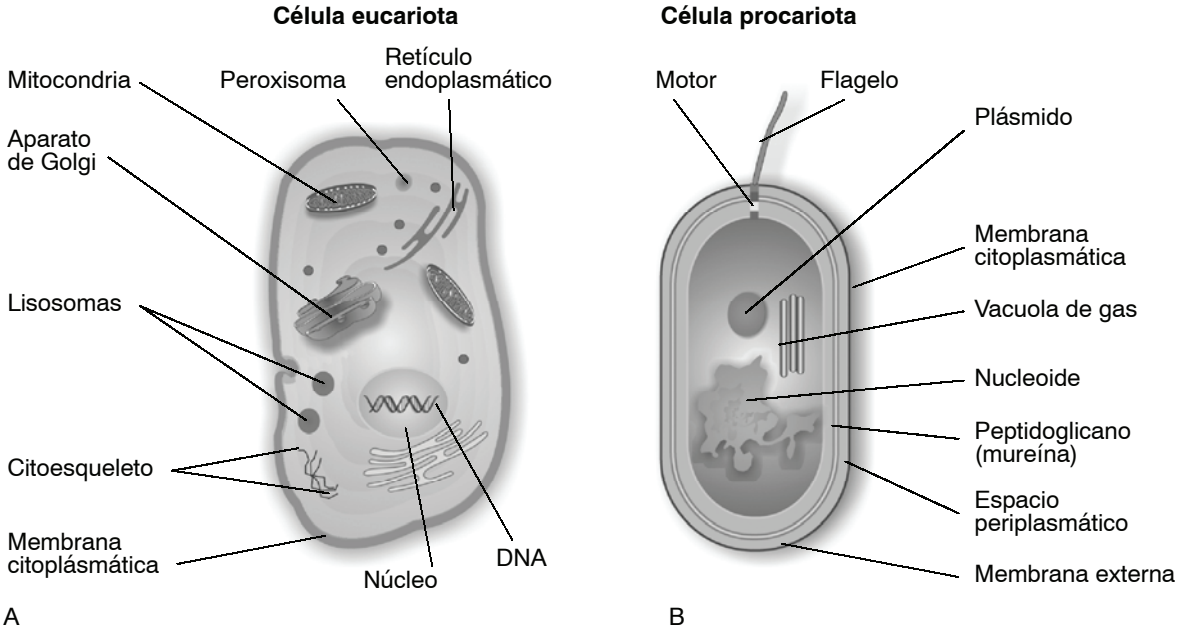


Figura 2-8. Esquema comparativo de la morfología de las células eucariotas y procariotas. ***A.*** Célula eucariota. ***B.*** Célula procariota.

decir, codifican sólo para una proteína (un gen, una proteína). Las células procariotas no tienen intrones en sus genes, sólo exones (secuencias codificantes). Además, sus genes son policistrónicos (codifican para más de una proteína) y pueden incluir genes adicionales independientes, pequeños, circulares o lineales, llamados plásmidos. En ingeniería genética pueden emplearse los plásmidos como vectores para llevar a cabo la reproducción de un DNA extraño utilizando el sistema de replicación bacteriana.

Procariotas

Son las formas más primitivas de vida en la Tierra. Las bacterias han cambiado muy poco en todo el transcurso

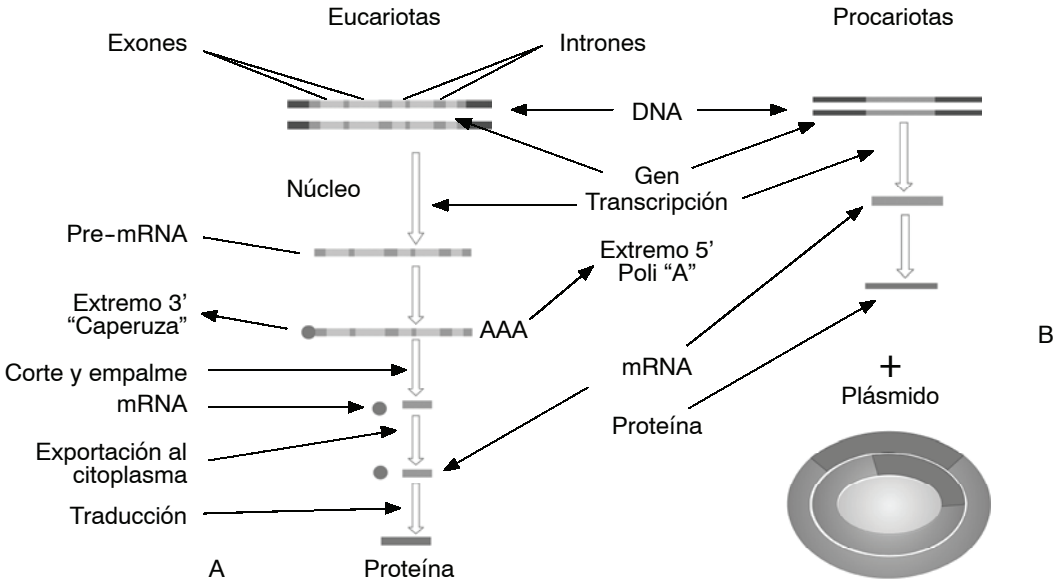


Figura 2-9. Esquema comparativo de los ácidos nucleicos en las células eucariotas y procariotas. ***A.*** Las células eucariotas tienen gran cantidad de DNA codificante y no codificante, por lo que su RNA debe sufrir corte y empalme (*splicing*) para eliminar sus intrones (secuencias no codificantes). ***B.*** Las células procariotas no tienen intrones en sus genes, sólo exones (secuencias codificantes). Además, sus genes son policistrónicos (codifican para más de una proteína) y pueden tener genes adicionales independientes, localizados en los plásmidos.

www.elsolucionario.org

de la evolución en la Tierra. Los procariotas (*pro* = antes, *karyon* = núcleo) son células enucleadas que carecen de organelos. Incluyen micoplasmas, bacterias y cianobacterias (antes llamadas algas verde-azuladas), que son células pequeñas, entre 1 y 5 μm de diámetro. El DNA procariota es una molécula circular sin histonas asociadas, por lo que se encuentra en contacto directo con el protoplasma, el cual tiene organelos que también carecen de membrana. Su organización es más sencilla que la de las células eucariotas. No forman verdaderos organelos, a excepción de los ribosomas. Se clasifican en dos grandes grupos:

1. **Las arqueobacterias**, que tienen una membrana plasmática rodeada de pared celular. Además, contienen un nucleoide de DNA y ribosomas, que a su vez se dividen en tres grupos: metanógenas, alófitas y termoacidófilas.
2. **Eubacterias o bacterias verdaderas.** Corresponde a un grupo muy amplio de microorganismos que incluye a las cianobacterias; su metabolismo puede ser autótrofo o heterótrofo.

Micoplasmas

Aunque son muy simples, estos microorganismos pueden aislarse y cultivarse en un medio libre de células. Tienen un diámetro aproximado de unos 40 nm. Son los únicos organismos procariotas conocidos que carecen de pared celular. Su DNA consiste en una doble hélice de unos 500 000 pares de bases (pb); realizan cerca de 100 reacciones enzimáticas diferentes.

Bacterias típicas. Escherichia coli

Es un bacilo que se encuentra en los tubos digestivos de los mamíferos; mide 1 x 2 μm y contiene cerca de 5 000 moléculas diferentes. Se reproduce cada 15 a 30 minutos en medios de cultivos apropiados con glucosa y sales inorgánicas. Su membrana plasmática está recubierta por la pared celular gruesa que le confiere la característica de ser gramnegativa.

Estas bacterias pueden sintetizar miles de proteínas diferentes y poseer hasta 10 000 ribosomas, por lo cual son muy apreciadas en biotecnología para producir proteínas recombinantes. No realizan fagocitosis ni pinocitosis, pero producen exoenzimas que actúan fuera de la membrana plasmática.

Las bacterias de otras especies poseen flagelos que son muy diferentes de los eucariotas; consisten en una fibra única triple helicoidal de varios μm de longitud que nace en un cuerpo basal (figura 2-10). Algunas bacterias se pueden transformar en esporas inactivas extraordinariamente resistentes a deshidratación y grandes cambios de temperatura, con la ventaja adicional de vivir en condiciones extremas o inadecuadas, pero que, al encontrar las condiciones propicias, se transforman otra vez en organismos metabólicamente activos.

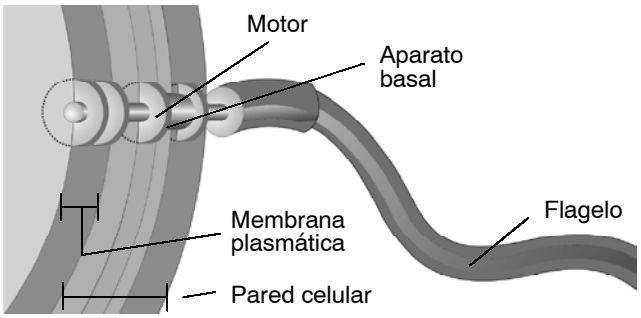


Figura 2-10. Esquema de un flagelo bacteriano.

Cianobacterias

Estos procariotas se encuentran como células independientes o como colonias pluricelulares. Tienen un metabolismo fotosintético similar al de las algas verdes con desprendimiento de oxígeno en el proceso. Contienen además los pigmentos ficobilina, ficocianina y ficoeritrina. Además de la fotosíntesis, las cianobacterias fijan N_2, transformándolo en NH_3, con el que sintetizan sustancias orgánicas nitrogenadas, como aminoácidos o nucleótidos. Para vivir sólo necesitan H_2O, luz, nitrógeno y CO_2.

Las bacterias poseen DNA pequeños llamados plásmidos, que son moléculas circulares o lineales; se consideran genes adicionales al cromosoma bacteriano, transferibles e independientes. Son capaces de pasar de una célula a otra, aun cuando sean de diferentes especies, formando parte de un proceso evolutivo, y poseen propiedades que les confieren resistencia a ciertos antibióticos. Los plásmidos pueden emplearse en ingeniería genética para transfectar células (introducir genes de interés con motivos de investigación) (figura 2-11). Eventualmente se transfectan dos genes, el de interés y un gen reportero (da una señal de la correcta transfección), como el gen de la proteína verde fluorescente (GFP); si se observa la fluorescencia de la GFP significa que la transfección fue exitosa (figura 2-12).

Eucariotas

Su nombre deriva del griego *eu,* bueno, verdadero y *karyon,* núcleo. Son organismos que se caracterizan por poseer células con un núcleo verdadero rodeado por membrana.

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

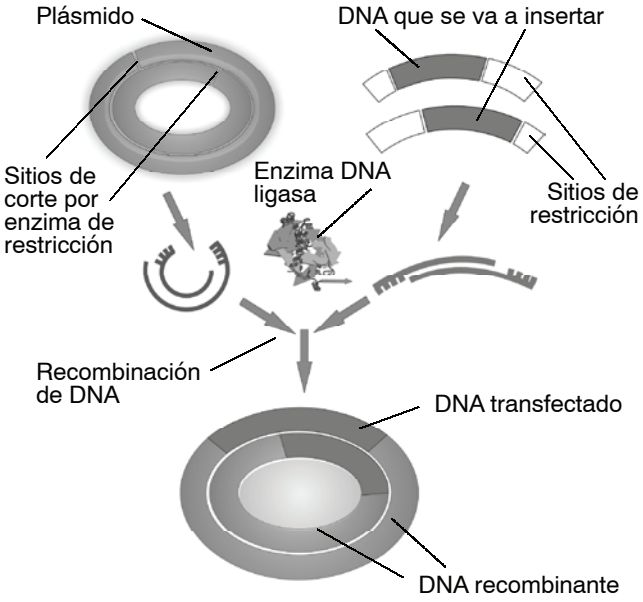


Figura 2-11. Esquema de la inserción de una molécula de DNA en un pequeño plásmido circular que posteriormente puede transfectarse en una bacteria como *E. coli* para producir una proteína recombinante.

Según investigaciones arqueológicas, su aparición data de aproximadamente hace 1 200 a 1 500 millones de años (cuadros 2-1 y 2-2).

Virus

Virus (del latín *virus,* veneno): son agentes infecciosos de naturaleza obligatoriamente intracelular para sintetizar su material genético. Contienen un ácido nucleico DNA o RNA y un recubrimiento proteico. Se consideran entidades no celulares de muy pequeño tamaño que en estado extracelular son inertes, por lo cual no se consideran seres vivos. Los retrovirus (del latín *retro,* girar hacia atrás) son virus que contienen una sola hebra de RNA como material genético y se reproducen copiando su RNA en DNA complementario (cDNA) dentro de la célula infectada usando la enzima transcriptasa reversa. Posteriormente, la hebra de DNA bicatenaria se inserta en el DNA de la célula huésped (éste es el mecanismo de infección e integración del virus de la inmunodeficiencia humana, VIH, que causa el SIDA).

Los virus dependen de células para su reproducción, síntesis de macromoléculas y otras funciones biológicas; no tienen ninguno de los organelos de las células, carecen de metabolismo para su duplicación o modificación y su mecanismo de acción es reemplazando funciones del DNA celular por su propio ácido nucleico; la célula huésped puede producir nuevos componentes de virus, en cuyo caso el ácido nucleico vírico es el molde de producción. Los virus son muy variados en tamaño (en el orden de los nanómetros) y esencialmente constan de un nucleoide envuelto por una cápsula proteica que lo protege. El nucleoide es un ácido nucleico, que puede ser DNA o RNA. La cápsula proteica que envuelve al nucleoide comprende desde 60 hasta miles de moléculas. Los virus más complejos pueden tener fosfolípidos y glucoproteínas recubriendo la cápsula, y pueden ingresar a la célula por endocitosis.

La liberación del virus puede ocurrir al romperse la célula infectada cuando es muy grande el número de virus o por gemación desde la superficie celular; la replicación viral depende del tipo de nucleoide. La replicación viral y el ensamblado de la cápsula permiten armar el virus completo, listo para abandonar la célula.

Algunos virus RNA se replican a expensas de la célula, pero utilizando como modelo su propio RNA vírico, ya que carecen de DNA, como es el caso del virus de la influenza y de la estomatitis vesicular. El RNA vírico actúa como mensajero y emplea a los ribosomas para fabricar la enzima RNA replicasa y otras proteínas. Esto permite que el RNA vírico forme múltiples copias de sí mismo (figura 2-13).

Fuera de las células huésped donde se multiplican los virus son simples partículas denominadas viriones, con morfología y composición regulares, a veces cristalizadas. Todos los tipos de células son susceptibles de infección por virus específicos (figura 2-14). Afortunadamente, la mayoría de los virus son específicos de especie; esto quiere decir que sólo afectan a una especie en particular, como es el caso del virus del SIDA, que sólo infecta al ser humano (figura 2-15).

Los virus tienen dos ciclos infecciosos: lisogénico y lítico:

1. **Ciclo lisogénico:** el genoma viral se incorpora en sitios específicos en el DNA del hospedero como un profago y se replica cuando el DNA hospedero lo hace, como ocurre en la división celular (figura 2-15).
2. **Ciclo lítico:** los profagos se separan del DNA del hospedero e inician la replicación viral con la consiguiente lisis celular, ya que literalmente revientan la célula por la gran cantidad de virus que se produce sin control (figura 2-16).

Priones

El prión es una forma alterada de una proteína celular funcional (PrPc) codificada por un gen localizado en el

www.elsolucionario.org

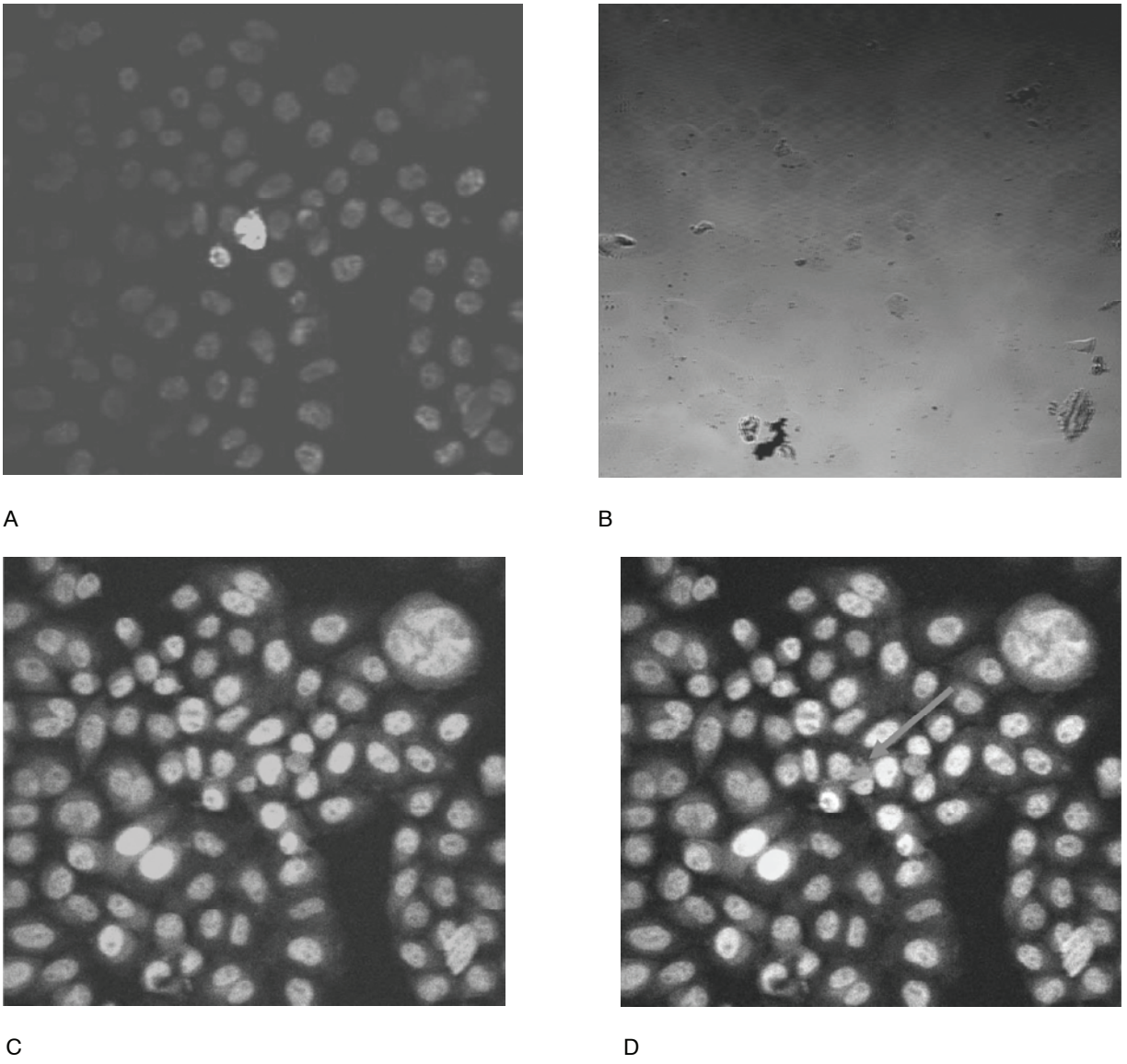


Figura 2-12. Experimento de doble transfección *in vitro*. Imágenes de microscopia confocal de la línea celular HeLa co-transfectada con el gen E2 del virus del papiloma humano 16 (VPH 16) y el gen reportero de la proteína verde fluorescente (GFP) que garantiza la correcta transfección por la fluorescencia que emite. ***A.*** Células HeLa apoptósicas marcadas con la técnica de TUNEL rodamina. ***B.*** Células HeLa vistas en contraste diferencial de interferencias (DIC) Varell. ***C.*** Células HeLa fluoresciendo por la GFP. ***D.*** Colocalización de las células HeLa co-transfectadas que están sufriendo apoptosis (flecha).

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

cromosoma 20 y con estructura secundaria de alfa-hélice, que cuando cambia de conformación a lámina beta se transforma en la proteína alterada (PrPSc) (figura 2-17).

Estos agentes patógenos son responsables de la encefalitis espongiforme clásica en ovejas y cabras, pero también desarrollada en vacas y humanos; se manifiesta en forma de sacudidas y temblores corporales, a los que siguen demencia y parálisis hasta ocasionar la muerte. La enfermedad no es una simple alteración genética, sino que se transmite; algunas explicaciones poco convincentes son que la proteína se acompaña de ácidos nucleicos indetectables que facilitan la infección vírica. La explicación más sólida es la propuesta de Stanley B. Prusiner, premio Nobel de Fisiología y Medicina en 1997 por el descubrimiento de los priones. Prusiner los describió en 1982 como partículas proteicas infecciosas sin ácido nucleico específico. Cuando se adquiere por ingestión la forma alterada de la proteína, ésta se incorpora a las células nerviosas, donde se une a la forma normal de la proteína, afectándola. Como los virus, los priones se autoperpetuan y causan enfermedad, pero, a diferencia de los virus, los priones no son inmunogénicos. Los priones resisten tratamientos con nucleasas,

www.elsolucionario.org

Cuadro 2-2. Cuadro comparativo entre células eucariotas y procariotas

Estructura/proceso	Procariotas	Eucariotas
Ribosomas	70S, con subunidades 50S y 30S	80S, con subunidades 60S y 40S
Pared celular	Constituida por mureína	Sólo en vegetales, y se forma de celulosa
Cromosoma	Único	Múltiples
División celular	Fisión binaria	Mitosis y meiosis
Reproducción	Asexual	Sexual o asexual
Mitocondria	Ausente. Los procesos bioquímicos similares se desarrollan en la membrana plasmática	Presente en células animales
Cloroplasto		Presente en células vegetales
Aparato de Golgi	Ausente	Presente
Lisosomas	Ausentes	Presente
Nucleolos	Ausentes	Presentes
Retículo endoplasmático	Ausente	Presente
Órganos de locomoción	Presentes	Cilios y flagelos que al corte transversal presentan una distribución característica de microtúbulos: 9 + 2
Membrana nuclear	Ausente	Presente
DNA	Desnudo y circular	Combinado con proteínas (histonas)
Membrana celular	Presente	Presente
Tamaño celular	Pequeño (< 5 μm)	Grande (> 10 μm)
Citoesqueleto	Ausente	Presente
Número de células	Siempre unicelulares	Unicelulares y pluricelulares

proteasas, cambios del pH y radiaciones UV, pero pierden infectividad calentándolos a 132 °C o sumergiéndolos durante dos horas con dodecilsulfato sódico (SDS). En la actualidad todavía no se conoce con precisión el mecanismo de propagación, aunque las recomendaciones para evitar la infección van encaminadas a no ingerir material de riesgo, como la carne de las llamadas "vacas locas".

Los humanos pueden infectarse con priones por dos vías:

1. Infección adquirida por la dieta, por procedimientos médicos como cirugía, inyecciones con hormona del crecimiento, trasplantes de córnea, etc.
2. Transmisión hereditaria esporádica. La enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (sus siglas en inglés son CJD) se presenta en una proporción de uno por un millón de personas al año.

DIVERSIDAD DE LOS SERES VIVOS

La unidad básica para clasificar a los organismos es la especie. Las especies muy cercanas se agrupan en géneros. Cada organismo recibe un nombre científico formado por dos palabras, el género y la especie, epíteto específico derivado del latín. El nombre científico del ser humano es *Homo sapiens.* El género *Homo* es monoespecífico, ya que en la actualidad no existen otras especies vivas que pertenezcan al género. Sin embargo, en el pasado hubo especies del género *Homo* actualmente extintas y descritas anteriormente, que representaban líneas evolutivas paralelas al *Homo sapiens,* como el *H. habilis,* el *H. erectus*, etc.

Después del género, los seres vivos se asignan a categorías cada vez más generales, en las que tienen cada vez menos características comunes. Las categorías más generales son los reinos, luego el filo, la clase, el orden, la familia, el género y por último la especie, cuyas variaciones son las razas. El consenso actual en cuanto al número de reinos que existen es de cinco: *Protista, Monera, Fungi, Plantae* y *Animalia*.

Reino *Protista* (amebas)

Los miembros de este reino son eucariotas unicelulares que por lo común son solitarias, a diferencia de las bacterias, que forman colonias (figura 2-18). Los protistas de tipo animal, o protozoarios, son más grandes que las bacterias y son móviles, mientras que los de tipo vegetal son inmóviles, fotosintéticos e incluyen algas con clorofila. Las algas difieren de las plantas por su ausencia de

www.elsolucionario.org

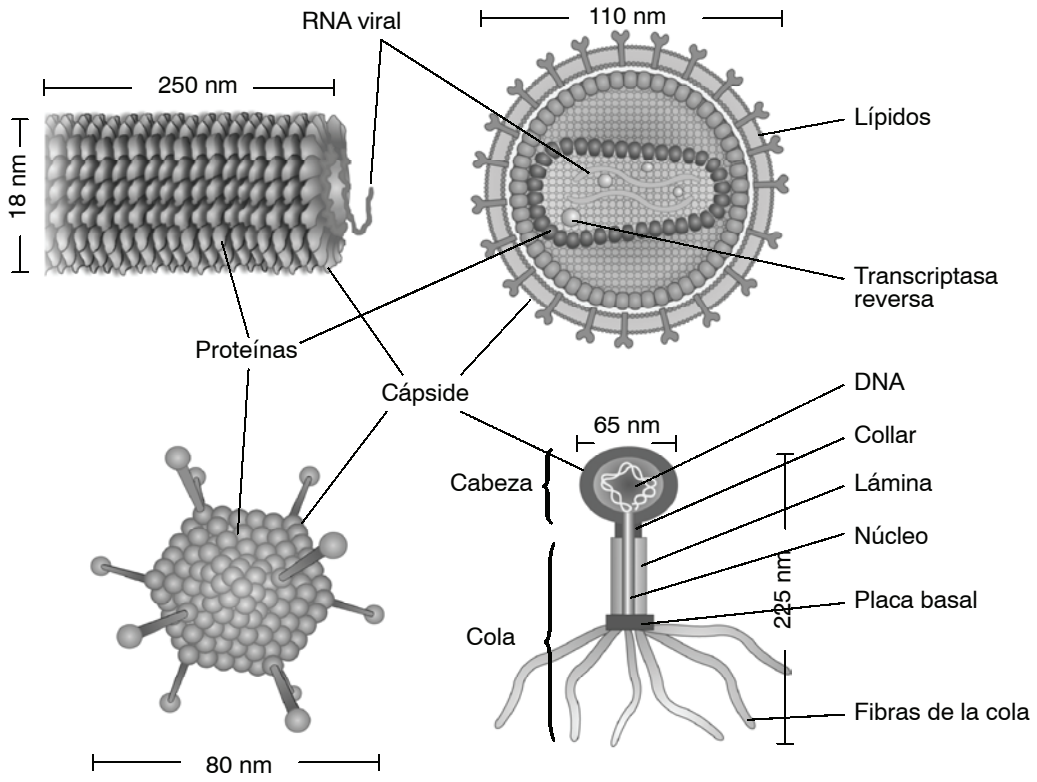


Figura 2-13. Esquema de la morfología de cuatro tipos de virus. En todos los casos se forman de un ácido nucleico, que puede ser DNA o RNA recubierto de la cápside proteica.

embriones y por carecer de órganos reproductores multicelulares. Algunos protistas fungoides se parecen a los hongos, pero difieren en su movilidad mediante flagelos.

Reino *Monera* (bacterias)

Las bacterias carecen de envoltura nuclear y poseen nucleoide en vez de un núcleo definido; también carecen de otros organelos limitados por una membrana. Las bacterias actúan como desintegradores en el ecosistema. Algunas son patógenas de los seres humanos (figuras 2-19 y 2-20) y de otros organismos; otras son fotosintéticas, ya que poseen clorofila, y otras son saprofitas (inocuas).

Comúnmente forman colonias o agrupaciones laxas de individuos. Las bacterias grampositivas tienen una pared celular compuesta de muchas capas de una macromolécula denominada peptidoglicano (disacáridos ligados a polipéptidos) y ácidos teicoicos (constituidos por alcohol y fosfato). Sin embargo, las bacterias gramnegativas tienen una fina capa de peptidoglicano situada en medio de dos capas lipoproteicas en su pared celular (figura 2-21). La capa externa, además de lipoproteínas, tiene lipopolisacáridos (LPS) y fosfolípidos.

Reino *Fungi* (hongos)

Los hongos son un grupo amplio de eucariotas que obtienen su alimento por absorción a través de su superficie en lugar de ingerirlos como hacen los animales; tampoco tienen clorofila como las plantas.

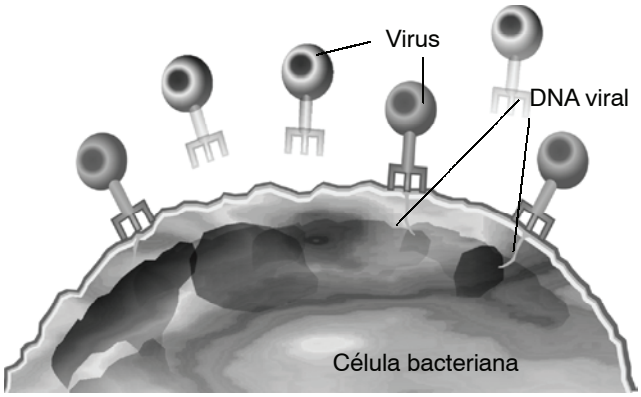


Figura 2-14. Esquema de virus bacteriófagos infectando una bacteria. Las flechas señalan el material genético viral (DNA) que está siendo inyectado por el virus dentro de la bacteria.

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

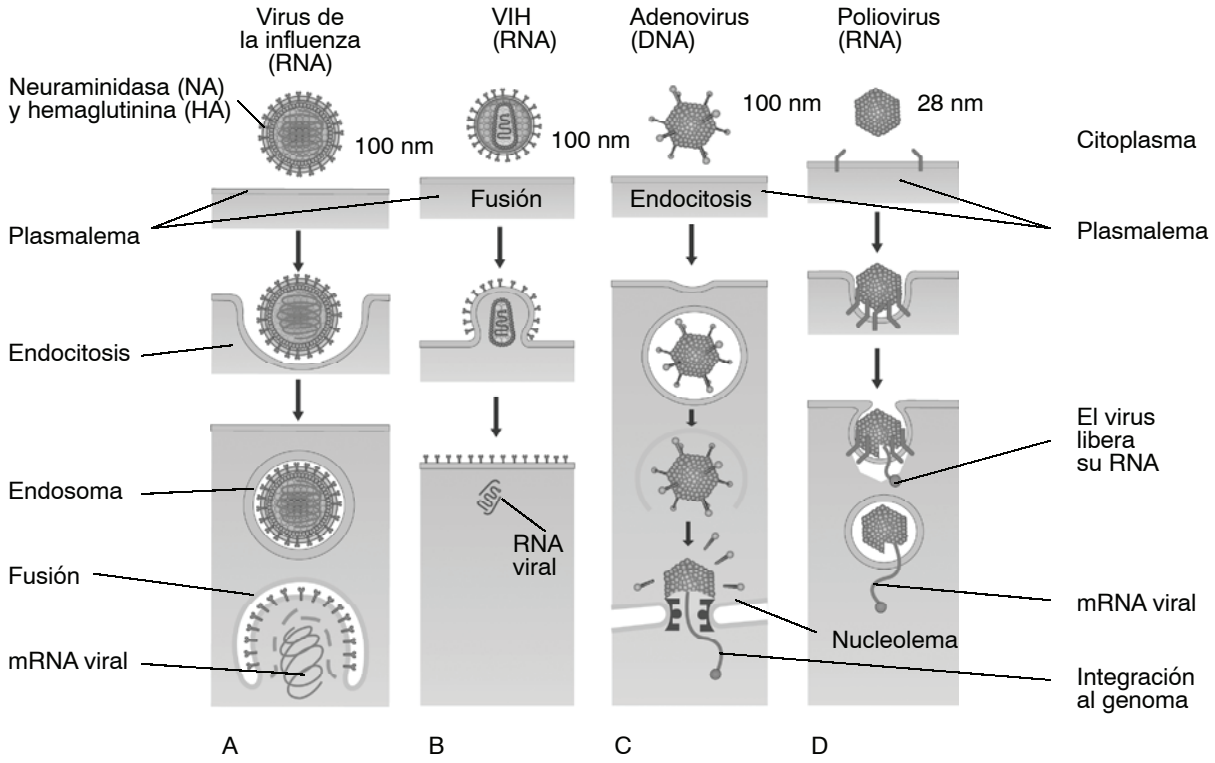


Figura 2-15. Esquema de cuatro mecanismos diferentes de infección viral en el humano. ***A*** y ***C.*** El adenovirus y el virus de la influenza son endocitados y expulsan su material genético infectante. ***B.*** El virus del SIDA se ancla a receptores de membrana específicos y se fusiona con el plasmalema, desde donde expulsa su RNA hacia el citoplasma. ***D.*** El virus que causa la poliomielitis ingresa a la célula por vesículas no recubiertas y expulsa su material genético infectante dentro de la célula.

Algunos hongos son desintegradores, como las bacterias que absorben nutrientes a partir de materia orgánica en descomposición; otros son parásitos. Durante su reproducción, los hongos pueden producir esporas sexuales y asexuales. En este reino se incluyen los mohos multicelulares, las setas, los hongos en repisa, las levadu-

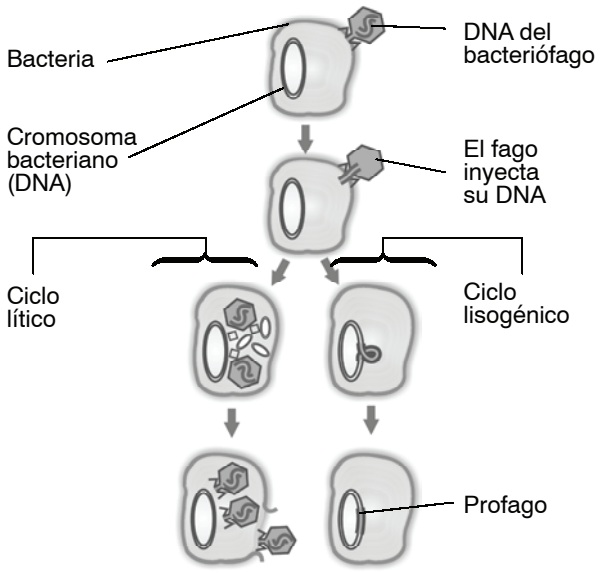


Figura 2-16. Esquema de los dos ciclos infecciosos que tienen los virus: lítico y lisogénico.

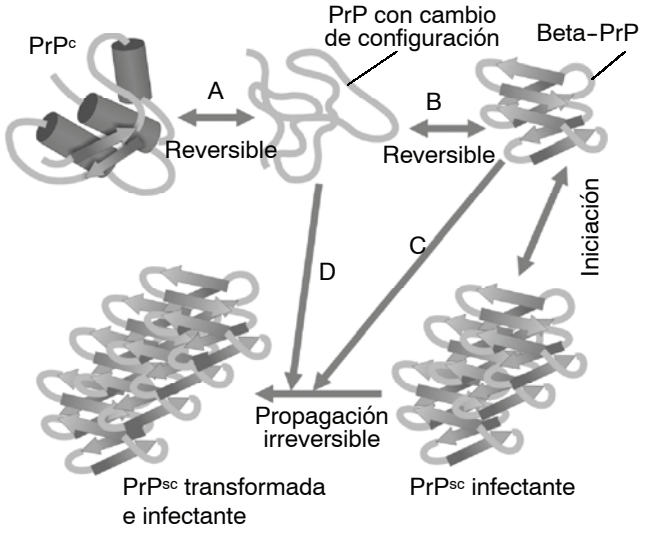
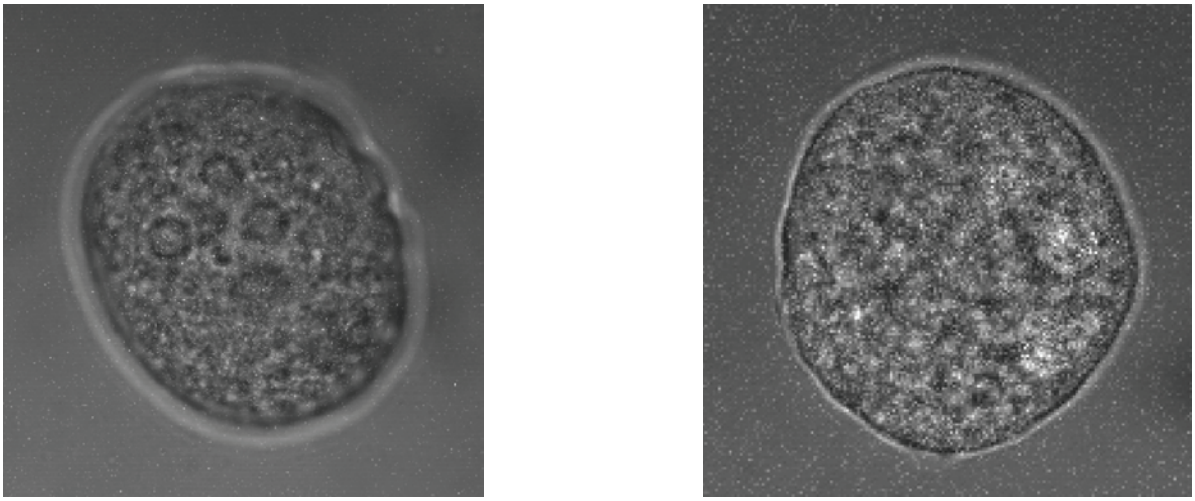


Figura 2-17. Esquema de la transformación de la proteína celular funcional (PrP^{c}) con estructura secundaria de alfa-hélice en la proteína alterada (PrP^{Sc}) o prión con estructura secundaria de lámina beta, la cual inicia una propagación irreversible transformando las proteínas PrP^{c} normales.

www.elsolucionario.org



A B

Figura 2-18. Fotografías del parásito unicelular eucariota *Entamoeba histolytica*, que parasita al humano. ***A.*** Contraste diferencial de interferencia tipo Varell. ***B.*** Autofluorescencia captada con el microscopio confocal LSM 5 Pascal® (Carl Zeiss) de la Escuela Médico Militar, UDEFA. 1000 X.

ras unicelulares, etc. (figura 2-22). Algunas especies de hongos, como *Penicillium notatum* y *P. chrysogenum*, de la familia *Aspergiliaceas,* se emplean en la fabricación de antibióticos, como la penicilina, descubierta en 1929 por Sir Alexander Fleming (1881-1955), quien obtuvo el premio Nobel de Medicina en 1945 por este descubrimiento.

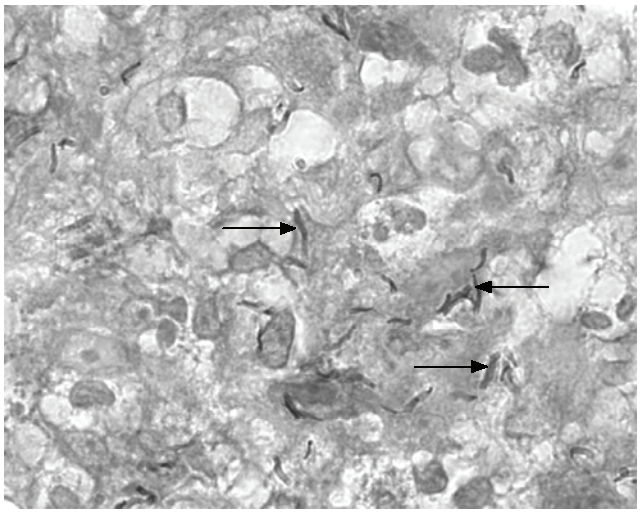


Figura 2-19. Tinción de Ziehl-Nielsen para bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR), como los de la lepra y la tuberculosis (*Mycobacterium*). Los bacilos BAAR se tiñen de rojo brillante (flecha), los eritrocitos de color anaranjado y el tejido en general de color azul. 1000 X.

Reino *Plantae* (vegetales)

Las plantas son organismos pluricelulares adaptados para realizar la fotosíntesis. Sus pigmentos fotosintéticos, como la clorofila, se ubican en los cloroplastos, organelos membranosos. Las células vegetales están rodeadas por una pared celular rígida que contiene celulosa, y típicamente tienen grandes sacos llenos de líquido, llamados vacuolas. En el reino *Plantae* se incluyen las plantas vasculares, las algas pluricelulares y las briofitas o musgos. Las plantas terrestres (también existen plantas acuáticas) necesitan ambientes húmedos para completar su ciclo reproductivo, aunque algunas se han adaptado a condiciones extremas de sequía, como las desérticas. Las briofitas sólo miden unos pocos centímetros, porque carecen de un sistema eficiente de transporte interno. Las plantas vasculares incluyen plantas con flores (angiospermas), helechos y gimnospermas (coníferas, como pinos, cipreses y araucarias); alcanzan enormes dimensiones porque tienen un sistema eficiente de transporte interno que lleva el agua y los nutrientes de una parte a otra de la planta (figuras 2-23 y 2-24).

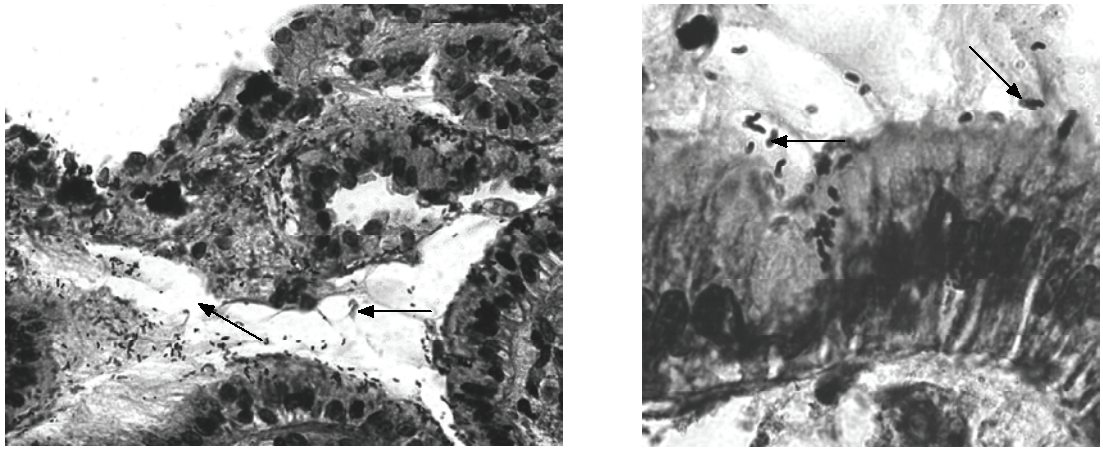
Reino *Animalia* (animales)

Todos los animales son pluricelulares heterótrofos (se alimentan de otros seres vivos, como plantas u otros animales).

Sus células carecen de clorofila; por esta razón obtienen sus nutrientes devorando otros organismos.

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org



A B

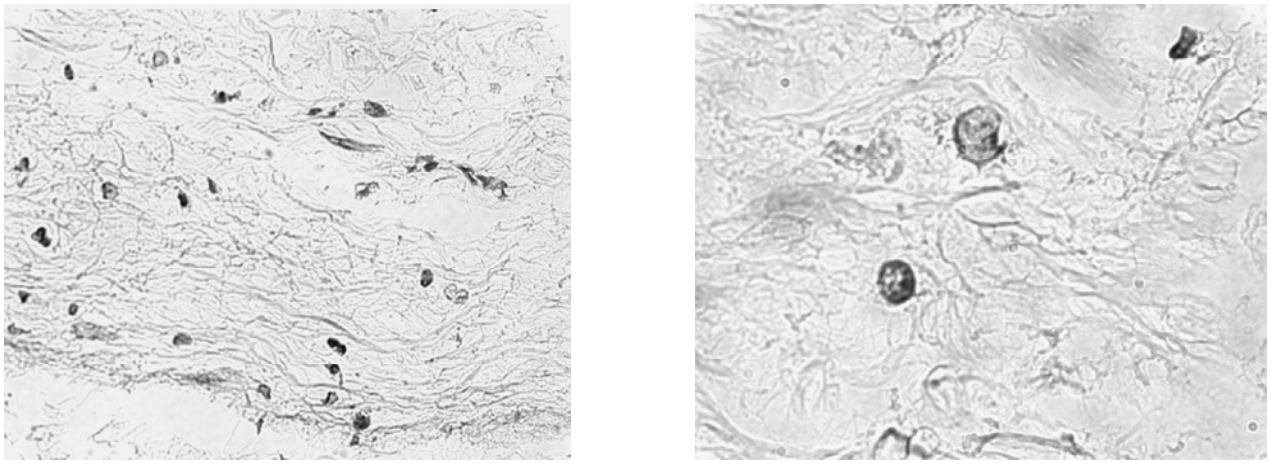
Figura 2-20. Tinción de Genta para demostrar *Helicobacter pylori.* Con esta técnica de tinción se muestra en negro la bacteria *Helicobacter pylori* (flechas); la metaplasia intestinal se observa de color azul violáceo, los neutrófilos se muestran de color rosa y los gránulos de eosinófilos de color anaranjado brillante. ***A.*** 400 X. ***B.*** 1000 X.

Los animales complejos tienen un alto grado de especialización en sus tejidos, y su cuerpo está muy organizado con órganos neurosensoriales y musculares complejos que les confieren movilidad (figuras 2-25 y 2-26).

Diferencias entre las células vegetales y las animales

A pesar de que las células vegetales y las animales son eucariotas, difieren entre sí en varios aspectos; aunque todas las células están delimitadas por membranas plasmáticas, las células vegetales están circundadas además por una pared rígida que contiene celulosa, lignina y otras biomoléculas. La pared celular permite el contenido de altas concentraciones de solutos sin que se produzca la ruptura celular. Una pared celular primaria típica de una dicotiledónea contiene de 25 a 30% de celulosa, 15 a 25% de hemicelulosa, 35% de pectina y 5 a 10% de proteínas (extensinas y lectinas) en relación al peso seco de la pared. La pared primaria mide de 1 a 3 μm de grosor. La mayoría de las células vegetales tienen un compartimiento grande o varios pequeños, denominados vacuolas, que se utilizan en el transporte y almacenamiento de agua, nutrientes y productos de desecho.

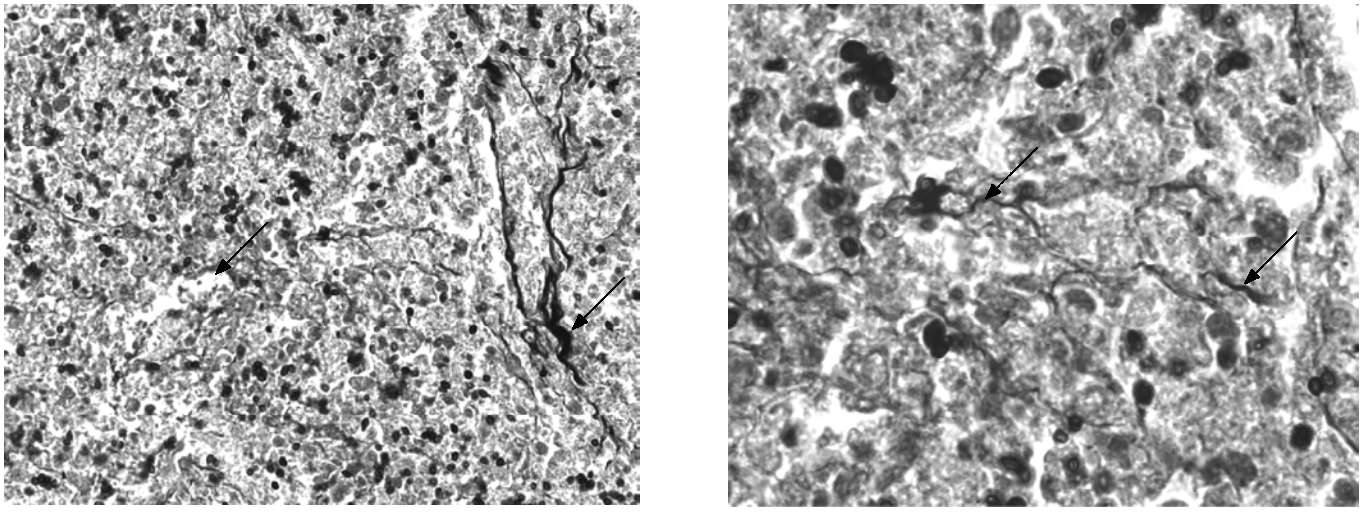
Las diferencias entre plantas y animales radican en el modo de obtener alimento. Los vegetales deben fijarse



A B

Figura 2-21. Tinción de Gram para demostrar bacterias gramnegativas. Con esta técnica de tinción se muestran en azul violeta las bacterias grampositivas y en rojo las bacterias gramnegativas. ***A.*** 400 X. ***B.*** 1000 X.

www.elsolucionario.org



A B

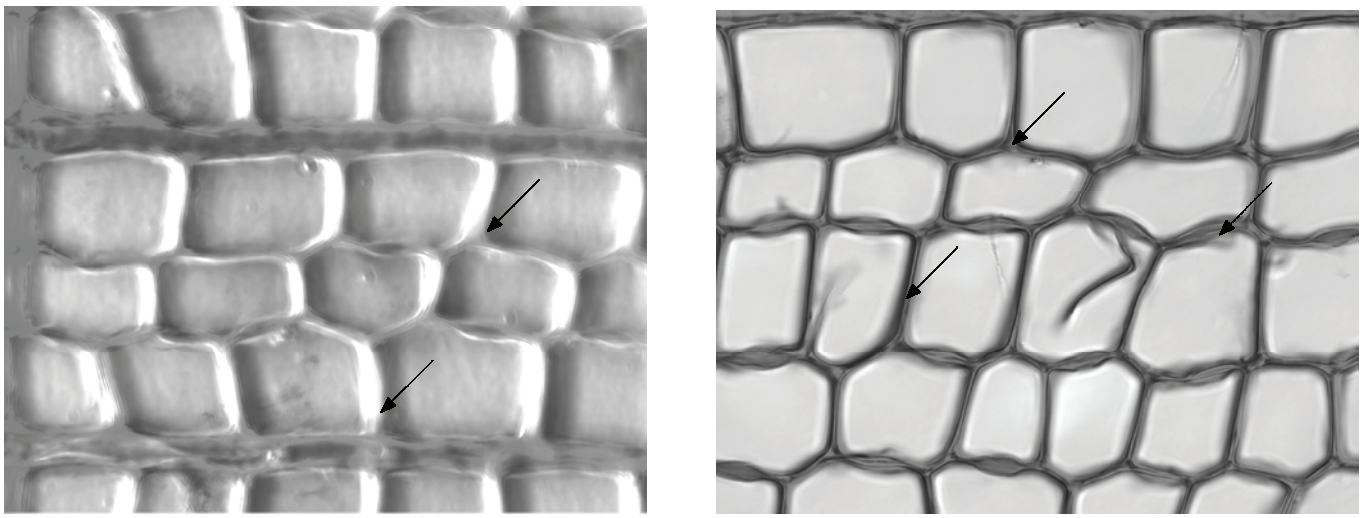
Figura 2-22. Tinción de Grocott para demostrar hongos. Con esta técnica de tinción se muestran en negro los hongos, en gris oscuro la mucina y en verde el citoplasma y el tejido conectivo. ***A.*** 400 X. ***B.*** 1000 X.

en el suelo para procurarse agua, desarrollar hojas y diseñar un eficaz sistema de transporte del agua y de nutrientes orgánicos y minerales. Esto implica el sacrificio de la locomoción y el riesgo continuo de depredación. Por esta razón tienen crecimiento indefinido. En los animales, en cambio, la necesidad de buscar alimento (y de evitar convertirse en alimento de especies carnívoras) les hizo desarrollar los órganos de los sentidos y la locomoción.

A diferencia de las células animales, las células vegetales carecen de ciertos organelos, como lisosomas y centriolos. Las células vegetales también contienen plástidos, los cuales son estructuras delimitadas por una doble membrana que producen y almacenan nutrientes o pigmentos; de los más comunes y abundantes son los cloroplastos.

Retos actuales en biomedicina molecular

Un enfoque central de la investigación posgenómica será, sin duda, entender los fenómenos celulares sobre la relación entre genes y proteínas. Para comprender la interacción genética y bioquímica de las células se re-



A B

Figura 2-23. Fotografías de las paredes celulares de la planta *Abies pectinata* (abeto). ***A.*** Contraste diferencial de interferencia tipo Varell. ***B.*** Hematoxilina y eosina. 400 X.

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

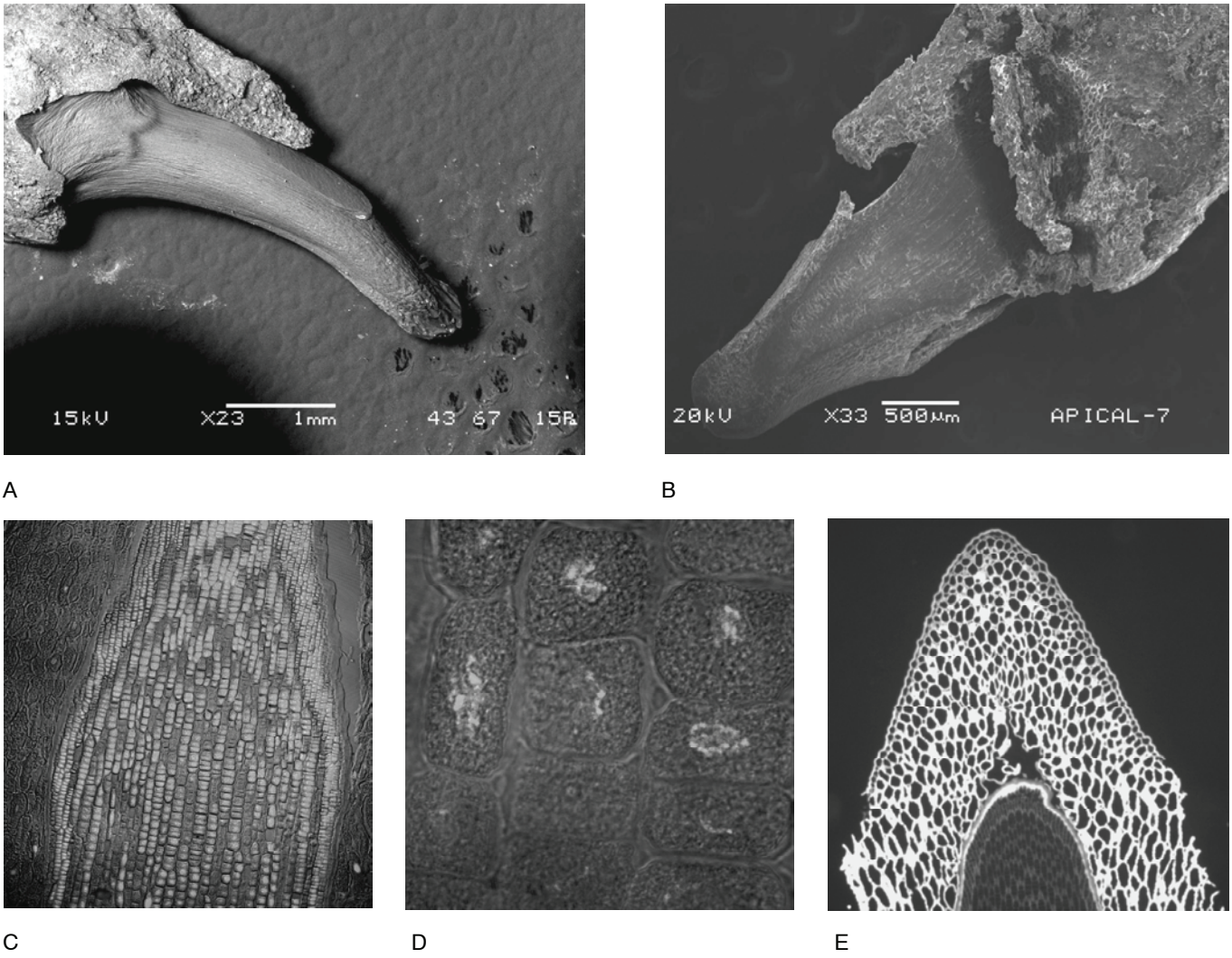


Figura 2-24. Eje embrionario de maíz. ***A.*** Microscopia electrónica de barrido (MEB) del hipocotilo (estructura que da origen al tallo y a las hojas) al alto vacío. ***B.*** MEB de la radícula del eje embrionario recubierta con partículas de oro. ***C.*** Mesocotilo (límite entre raíz y tallo) a 100 X. ***D.*** Células del meristemo apical a 1000 X. ***C*** y ***D.*** Colocalización de yoduro de propidio y antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) en DNA sobre fondo de Varell. ***E.*** Microscopia confocal de lignina (polímero de alcoholes derivados del fenilpropano, principalmente cumarilo, coniferilo y sinapilo) de pared celular de células de radícula a 633 nm de longitud de onda a 200 X. (Fotos trabajo bacterial de Dairo Jesús Orjuela Henry.)

quiere del desarrollo de una estructura matemática (el lenguaje universal). Los recientes adelantos experimentales en secuenciación y en ingeniería genética han hecho factible este acercamiento a través de la aplicación de redes sintéticas de genes a modelos matemáticos. Estos desarrollos han señalado la urgencia de una disciplina emergente de circuitos genéticos sobre la dinámica de procesos celulares, denominada ingeniería genética, que tiene aplicaciones importantes en el genoma funcional, nanotecnología y terapia genética de la célula. La autorregulación por generaciones múltiples es un tipo de regulación genética que se está explorando en la actualidad. La regeneración ocurre a través de la autorregulación, en donde una proteína modifica directa o indirectamente su propia tasa de producción como retroalimentación negativa.

En un futuro próximo se integrarán al estudio de la biomedicina y de la práctica profesional del médico disciplinas que cambiarán para siempre el rumbo de la medicina como hoy la percibimos: la farmacogenética y la farmacogenómica, en la generación de medicamentos más efectivos y menos tóxicos con base en la estructura genómica de cada población; estas nuevas estrategias terapéuticas, a su vez, forman parte de una nueva tendencia en el estudio de la medicina: la medicina genómica, la cual consiste en identificar las variaciones en el genoma humano que confieren riesgo de padecer enfermedades comunes, dando lugar a una práctica médica

www.elsolucionario.org

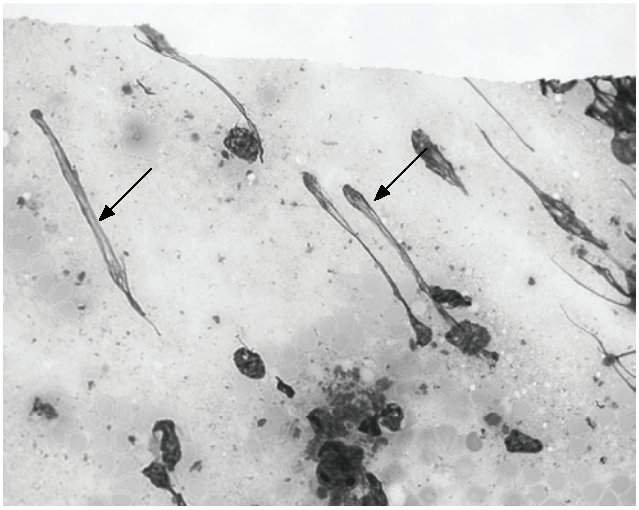


Figura 2-25. Fotografía del parásito invertebrado *Leishmania donovanii* que infecta al humano. Se observan las larvas filiformes en un frotis. 400 X.

Figura 2-26. Fotografía de neuronas de rata teñidas con la técnica argéntica de Golgi-Cox, la cual utiliza sales de metales pesados que se impregnan en las neuronas. 200 X.

más individualizada, más preventiva y predictiva, ya que permitirá identificar a los individuos con riesgo de desarrollar enfermedades comunes antes de que aparezcan los síntomas y así se evitarán o retrasarán sus manifestaciones, complicaciones y secuelas.

La investigación histológica (biología tisular) se ha desarrollado de manera explosiva en años recientes, ya que al incorporar a la biología molecular, la inmunología y la microscopia en todas sus modalidades: electrónica, confocal, multifotónica, etc., ha sido posible el desarrollo de técnicas de investigación poderosas, como la hibridación *in situ* fluorescente (FISH) para el estudio de los ácidos nucleicos, DNA y RNA en células y tejidos (biología molecular aplicada a la histología) y la inmunohistoquímica e inmunofluorescencia (inmunología aplicada a tejidos).

Nos encontramos en el umbral de una gran revolución que se avecina en la biología y en la práctica médica y que hasta ahora parece ser propiedad sólo de la comunidad científica: la era genómica.

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

www.elsolucionario.org

Capítulo 3

Citoplasma

Dolores Javier Sánchez González, Dairo Jesús Orjuela Henry, G. Yazmín Arellano Salazar

INTRODUCCIÓN

La mayoría de las células son invisibles para el ojo humano; el tamaño y la forma varían con las funciones celulares. El citoplasma confiere la forma y el tamaño celular; se compone de citosol, citoesqueleto y organelos. Este componente celular está limitado por una membrana o plasmalema y rodea al núcleo.

Citosol

Está formado principalmente de agua con iones disueltos, moléculas pequeñas y macromoléculas solubles en agua; en el citosol se encuentran ribosomas, aunque la mayoría están asociados al retículo endoplasmático rugoso (RER). Los ribosomas son partículas insolubles de 25 nm donde ocurre la síntesis de proteínas. En el citosol se encuentran disueltas varias sustancias, entre ellas iones inorgánicos, aminoácidos, glucosa y macromoléculas como enzimas, ácidos ribonucleicos (RNA), etc. En el citosol también tienen lugar gran parte de los procesos metabólicos de la célula.

Organelos

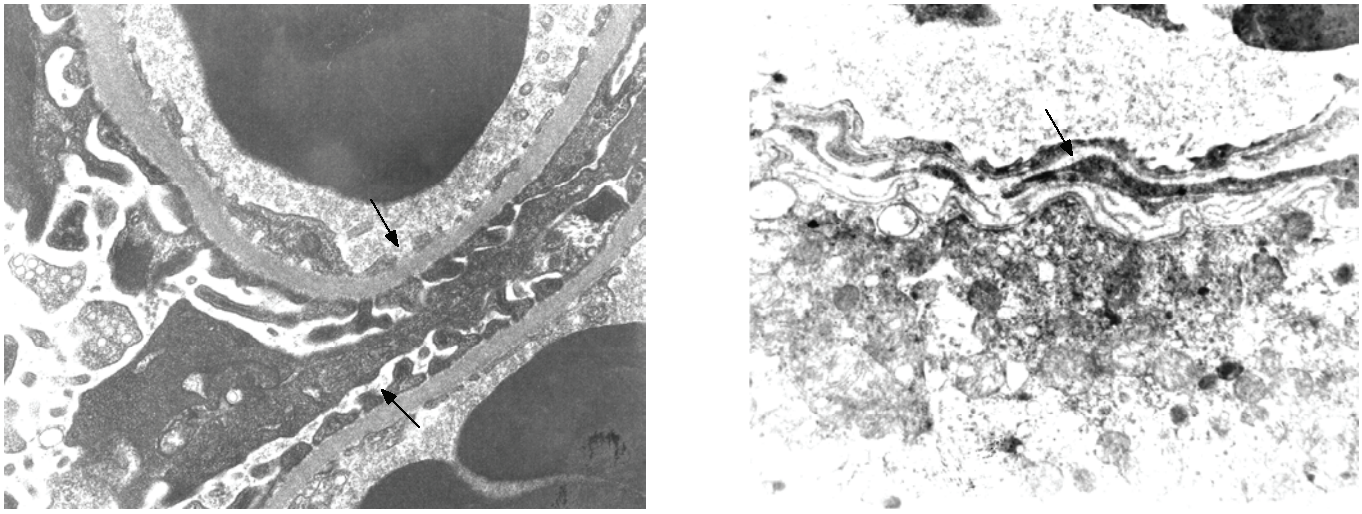
Los organelos más conocidos fueron descritos inicialmente, mediante el microscopio óptico, como gránulos, filamentos, laminillas, etc. Con el microscopio electrónico se demostró que estos organelos son estructuras huecas que están rodeadas por delgadas membranas. La organización estructural del citoplasma en cavidades separadas tiene importancia en muchos aspectos. Los procesos bioquímicos celulares tienen lugar en las membranas o en la superficie de las membranas y, en consecuencia, muchas de las enzimas que catalizan las reacciones químicas están localizadas allí. Aunque la membrana celular y las membranas de los distintos organelos presentan el mismo aspecto ultraestructural, en realidad son muy diferentes bioquímica y funcionalmente, ya que contienen sus propias moléculas especializadas y sistemas enzimáticos característicos. La división del citoplasma en organelos limitados por membranas permite, además, mantener separadas las enzimas de sus sustratos, por lo que la célula puede ejercer control sobre los procesos metabólicos y mantener notables diferencias de concentración (gradientes electroquímicos) en el citoplasma. También existe un importante transporte de moléculas específicas entre los organelos, proporcionado por el citoesqueleto.

MEMBRANA CELULAR O PLASMALEMA

La célula está rodeada por una membrana denominada membrana celular o plasmalema. La membrana delimita el territorio de la célula y controla su contenido químico. La membrana plasmática representa el límite entre el medio extracelular y el intracelular; a través de ella se transmiten mensajes que permiten a las células realizar numerosas funciones. Es tan delgada que no se puede observar con el microscopio óptico. Con el mi-

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org



A B

Figura 3-1. Micrografías electrónicas de membranas celulares. ***A.*** Membranas celulares de células endoteliales glomerulares (flechas); se observan los pedicelos de los podocitos renales (prolongaciones). ***B.*** Unión de dos membranas plasmáticas entre células endoteliales (flecha). 25 000 X.

croscopio electrónico se visualiza como una línea de alrededor de 8 nm de espesor que con mayor aumento aparece compuesta de dos capas densas de unos 2.5 nm de espesor, separadas por una capa más clara de alrededor de 3 nm de ancho.

En la membrana las proteínas constituyen su 55%, los fosfolípidos 25%, el colesterol 13%, otros lípidos 4% y los hidratos de carbono 3%. Esta estructura trilaminar también se localiza en las membranas que rodean los organelos citoplasmáticos, pero estas últimas difieren en su composición bioquímica. Sus características son las siguientes:

1. Regula el paso de sustancias hacia el interior de la célula y viceversa. Permite el paso de ciertas sustancias e impide el paso de otras actuando como barrera con permeabilidad selectiva, el intercambio de sustancias y controlando el flujo de información entre las células y su entorno.
2. Es una estructura continua que rodea a la célula. Por un lado está en contacto con el citoplasma (medio interno) y, por el otro, con el medio extracelular que representa el medio externo.
3. Contiene receptores específicos que permiten a la célula interaccionar con mensajeros químicos y emitir la respuesta adecuada y, por ende, proporcionan el medio apropiado para el funcionamiento de las proteínas de membrana.
4. Aísla y protege a la célula del ambiente externo, confiriéndole su individualidad al separarla del medio externo (figura 3-1).

Composición molecular de la membrana celular

Lípidos

La estructura molecular de la membrana celular es el denominado modelo del mosaico fluido propuesto por Singer y Nicholson en 1972, que presenta las siguientes características:

- Los lípidos y las proteínas integrales se hallan dispuestos en mosaico.
- Este modelo considera que la membrana es como un mosaico fluido en el que la bicapa lipídica es la red cementante, y las proteínas incrustadas en ella interaccionan unas con otras y con los lípidos.

Según este modelo, la membrana celular se compone de una capa bimolecular de lípidos, en la cual a determinados intervalos se incluyen unidades proteicas que forman un mosaico con la doble capa lipídica. En la membrana de la célula eucariota se localizan tres tipos de lípidos: fosfolípidos, glucolípidos y colesterol. La doble capa lipídica es relativamente impermeable a la mayoría de las moléculas hidrosolubles y representa la estructura básica de la membrana. Las moléculas de proteínas llevan a cabo las funciones más especializadas de la membrana y se consideran disueltas en la bicapa lipídica. Alrededor de la mitad de los lípidos de la membrana celular son fosfolípidos; los más importantes son la fosfatidilcolina (lecitina), fosfatidiletanolamina, fosfati-

www.elsolucionario.org

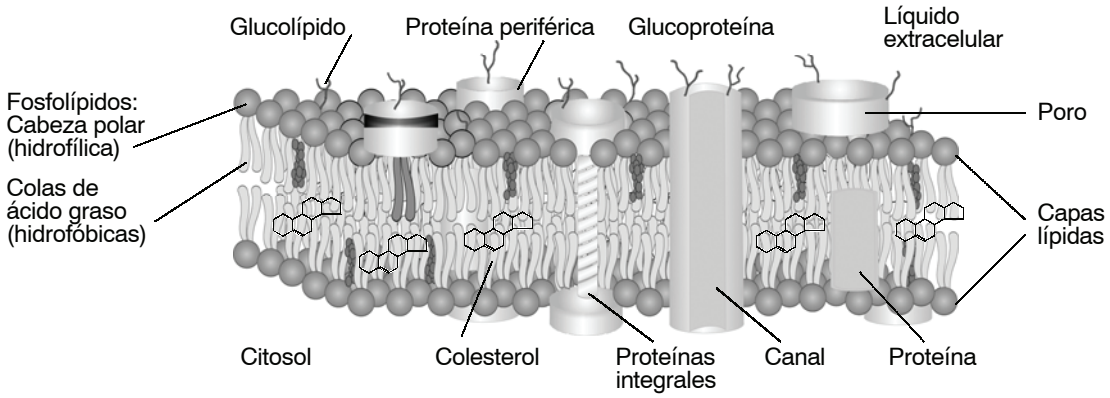


Figura 3-2. Estructura molecular de la membrana plasmática. Modelo de mosaico fluido. Se muestran la doble capa de fosfolípidos, moléculas de colesterol y proteínas diversas.

dilserina y esfingomielina. Estas moléculas son anfipáticas con un extremo hidrofílico muy polar (la cabeza) y un extremo hidrofóbico no polar, compuesto por dos largas cadenas de ácidos grasos (la cola). Los extremos no polares forman en conjunto el interior hidrofóbico de la membrana, mientras que los extremos muy polares se orientan hacia la superficie.

La doble capa fosfolipídica es fluida, y tiene características de líquido. Las moléculas de lípido de cada monocapa se encuentran en constante movimiento donde intercambian sus lugares con las moléculas vecinas. La viscosidad de la capa depende, en parte, de la composición lipídica; también depende de las cadenas de ácidos grasos de las moléculas de fosfolípido que contienen por lo general uno o más dobles enlaces (es decir, son no saturados). Esto causa un pequeño cambio de dirección de la cola, por lo que las moléculas de lípidos presentan un empaquetamiento menos denso y la capa es más fluida.

La otra mitad de las moléculas lipídicas de la membrana está compuesta por colesterol, que contribuye a que la doble capa lipídica sea menos fluida. Esto se debe al rígido sistema cíclico esteroide de las moléculas de colesterol, que se interpone entre las mitades externas de las colas de los fosfolípidos.

Las moléculas de colesterol también impiden que la viscosidad disminuya al descender la temperatura, dado que no permite el empaquetamiento denso (la cristalización) de las cadenas de ácidos grasos. En conjunto, el colesterol y las demás moléculas esteroides de la membrana tienen un efecto estabilizador sobre la viscosidad (figura 3-2).

La membrana plasmática no es una estructura estática; sus componentes tienen movimiento, lo que le proporciona fluidez. Los movimientos que realizan los lípidos son:

- **Rotación:** consiste en giros de las moléculas en torno a su eje. Es muy frecuente y responsable en parte de los otros movimientos.
- **Difusión lateral:** las moléculas se difunden de manera lateral dentro de la misma capa. Es el movimiento más frecuente.
- **Flip-flop:** es el movimiento de la molécula lipídica de una monocapa a la otra gracias a unas enzimas llamadas flipasas. Es el movimiento menos frecuente, por ser energéticamente más desfavorable.
- **Flexión:** son los movimientos producidos por las colas hidrófobas de los fosfolípidos (figura 3-3).

Las moléculas de fosfolípidos están densamente agrupadas alrededor de las moléculas proteicas y, en algunos casos, contribuyen al anclaje de estas últimas a la membrana celular. Los lípidos de la doble capa se pueden desplazar sobre la superficie en cada capa mediante difusión lateral.

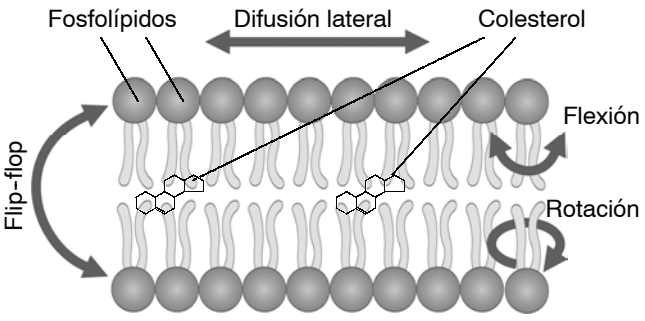


Figura 3-3. Tipos de movimientos de los lípidos. La fluidez es una de las características más importantes de las membranas. Depende de factores como temperatura, que incrementa la fluidez, mientras que la presencia de colesterol endurece las membranas, reduciendo su fluidez y permeabilidad.

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

Durante este desplazamiento, las moléculas lipídicas mantienen siempre la misma orientación, con las cabezas hidrofílicas dirigidas hacia la superficie de la membrana y las colas que protruyen hacia el interior. La difusión lateral se produce con gran rapidez, por lo que cada molécula lipídica se puede mover de un extremo de la célula a otro en escasos segundos. Por el contrario, el desplazamiento de las moléculas de fosfolípidos desde una mitad de la bicapa hacia la otra, o *flip-flop* (del inglés *flip-flop*, inversión repentina de la dirección), se produce sólo a intervalos de horas, días o semanas.

El movimiento *flip-flop* de los fosfolípidos se puede producir con gran velocidad en las membranas del retículo endoplasmático liso (REL), cuando se lleva a cabo la síntesis de nuevo material de membrana, dado que, en este caso, el desplazamiento es catalizado por enzimas denominadas translocadoras de fosfolípidos o flipasas. La capacidad de estas flipasas de desplazar determinadas moléculas de fosfolípidos desde una mitad de la membrana a otra en relación con la síntesis de la membrana celular en el REL es esencial para una importante propiedad de la membrana celular, su composición bioquímica asimétrica.

De esta manera, los fosfolípidos de la mitad externa de la membrana se componen casi con exclusividad de fosfatidilcolina y esfingomielina (moléculas lipídicas con colina en el extremo polar), mientras que la mitad interna de la membrana contiene una proporción mayor de los fosfolípidos fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina. Estos últimos contienen cargas negativas, lo cual produce una notable diferencia de carga eléctrica entre las dos caras de la doble capa lipídica.

La composición asimétrica de la membrana celular tiene importancia funcional en otro aspecto, dado que la fosfatidilserina y otro fosfolípido relacionado con la mitad interna de la membrana, el fosfatidilinositol, intervienen en la transmisión de determinadas señales desde el plasmalema hacia el interior de la célula. En la composición química de la membrana intervienen lípidos, proteínas y glúcidos en proporciones aproximadas de 40, 50 y 10%, respectivamente.

Proteínas

Las proteínas son los componentes de la membrana que desempeñan las funciones específicas (transporte, comunicación, etc.). Al igual que en el caso de los lípidos, las proteínas pueden girar alrededor de su eje y muchas de ellas pueden desplazarse lateralmente (difusión lateral) por la membrana. Las proteínas de membrana se clasifican en:

- **Proteínas periféricas:** se localizan a un lado u otro de la bicapa lipídica y están unidas débilmente a las cabezas polares de los lípidos de la membrana u otras proteínas integrales por enlaces de hidrógeno.
- **Proteínas integrales:** están íntimamente unidas a los lípidos, suelen atravesar la bicapa lipídica una o varias veces; por esta razón se les llama proteínas transmembranales. Aunque los diferentes tipos de proteínas que pueden encontrarse dependen del tipo celular de que se trate, en general tienen unas funciones comunes:
  - Forman canales iónicos que facilitan el paso de iones y moléculas específicas a través de la membrana.
  - Actúan como receptores en los procesos de comunicación entre células y poseen actividades enzimáticas.
  - Fijan los filamentos del citoesqueleto a la membrana celular.
  - Fijan las células a la matriz extracelular.
  - Son específicas.
  - Reconocen, por medio de receptores, a antígenos y células extrañas.

Azúcares, carbohidratos o glúcidos

Los azúcares se encuentran en su mayor parte limitados a la superficie externa de las células eucariotas, por lo que contribuyen a la asimetría de la membrana. Se pueden poner en evidencia mediante microscopio electrónico, en forma de una capa blanca por fuera de la membrana celular.

Estos glúcidos son oligosacáridos unidos a lípidos (glucolípidos) o a proteínas (glucoproteínas). Esta cubierta de glúcidos es la *tarjeta de identidad* de las células y constituye la cubierta celular o glucocáliz, a la que se atribuyen funciones fundamentales:

- Presenta propiedades inmunitarias, participa en los procesos de coagulación de la sangre y en las reacciones inflamatorias; los glúcidos unidos a proteínas del glucocáliz de los glóbulos rojos representan los antígenos propios de los grupos sanguíneos del sistema ABO.
- Protege la superficie de las células de posibles lesiones.
- Confiere viscosidad a las superficies celulares, permitiendo el deslizamiento de células en movimiento, como los leucocitos.
- Interviene en los fenómenos de reconocimiento celular, particularmente importantes durante el

www.elsolucionario.org

desarrollo embrionario, y en los procesos de rechazo de injertos y trasplantes.
- En los procesos de adhesión entre óvulos y espermatozoides, éstos distinguen los óvulos de la propia especie de los de especies diferentes.

La mayor parte de los componentes de la membrana celular se forman en una red tridimensional irregular de espacios (compartimentalización), rodeada a su vez por una membrana y llamada retículo endoplasmático (RE), en el cual se forman también los materiales que son secretados por la célula. El aparato de Golgi está formado por pilas de sacos aplanados envueltos en membrana; este aparato recibe las moléculas formadas en el RE, las transforma y las dirige hacia distintos lugares de la célula.

Los lisosomas son pequeños organelos de forma irregular que contienen reservas de enzimas necesarias para la digestión celular de numerosas moléculas indeseables. Los peroxisomas son vesículas pequeñas envueltas en membrana que proporcionan un sustrato delimitado para reacciones en las cuales se genera y degrada peróxido de hidrógeno, un compuesto reactivo que puede ser peligroso para la célula. Las membranas forman muchas otras vesículas pequeñas encargadas de transportar materiales entre organelos. En una célula animal típica, los organelos limitados por membrana pueden ocupar hasta la mitad del volumen celular total.

Transporte a través de la membrana

Es el intercambio de materia entre el interior de la célula y su ambiente externo. La bicapa lipídica de la membrana actúa como una barrera que separa dos medios acuosos, el medio donde vive la célula y el medio interno celular. Las células requieren nutrientes del exterior y deben eliminar sustancias de desecho procedentes del metabolismo y mantener estable su medio interno. La membrana presenta una permeabilidad selectiva, ya que permite el paso de pequeñas moléculas, siempre que sean lipófilas, pero regula o bloquea el paso de moléculas no lipófilas. Los mecanismos de transporte se muestran en las figuras 3-4 y 3-5.

Transporte de moléculas de baja masa molecular	Transporte pasivo	Difusión facilitada Difusión simple
	Transporte activo	Bomba de sodio/potasio Otras bombas
Transporte de moléculas de elevada masa molecular	Endocitosis	Pinocitosis Fagocitosis Mediada por un receptor
	Exocitosis	
	Transcitosis	
	Potocitosis	

Figura 3-4. Esquema de mecanismos de transporte a través de las membranas. Se dividen en dos grandes grupos: transporte de moléculas de baja masa molecular y transporte de elevada masa molecular.

Transporte de moléculas de baja masa molecular

Transporte pasivo

El transporte pasivo es un proceso de difusión de sustancias a través de la membrana. Se produce siempre a favor del gradiente de concentración, es decir, de donde hay más hacia el medio donde hay menos. Este transporte puede darse por difusión simple y facilitada (figura 3-5).

Difusión simple

Es el paso de pequeñas moléculas a favor del gradiente de concentración; puede realizarse a través de la bicapa lipídica o a través de canales proteicos.

1. **Difusión simple a través de la bicapa:** este mecanismo de ingreso es propio de las moléculas lipídicas, como las hormonas esteroideas, anestésicos como el éter y fármacos liposolubles;

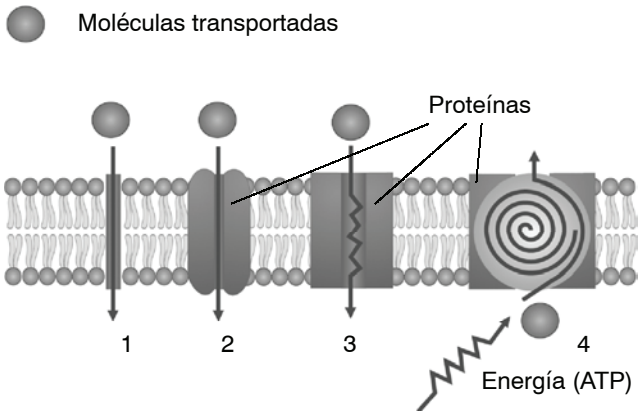


Figura 3-5. Transporte de moléculas de baja masa molecular. ***1.*** Difusión simple a través de la bicapa. ***2.*** Difusión simple a través de canales. ***3.*** Difusión facilitada. ***4.*** Transporte activo.

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

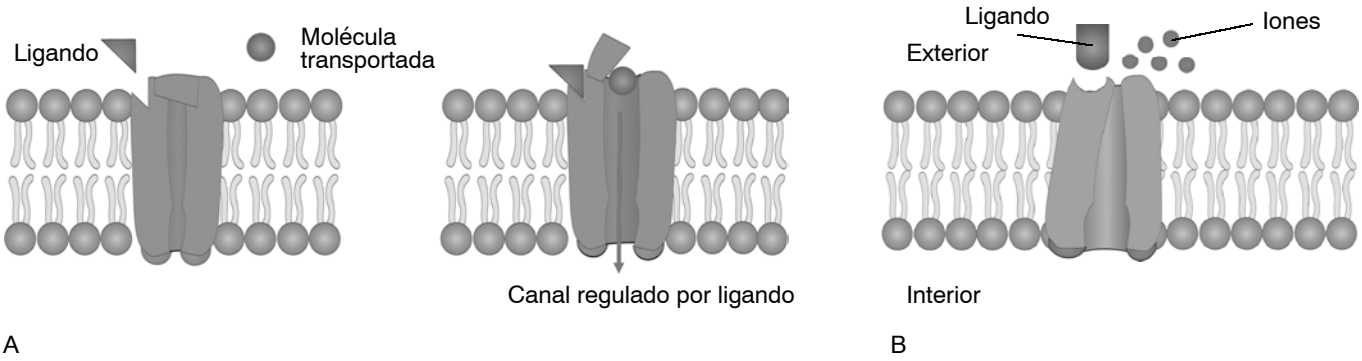


Figura 3-6. ***A.*** Difusión simple a través de canales. Este proceso se realiza mediante las denominadas proteínas de canal, que contienen un orificio o canal interno cuya apertura está regulada por ligandos. ***B.*** Esquema de un canal iónico.

también de sustancias apolares como el oxígeno y el nitrógeno. Algunas moléculas polares de muy pequeño tamaño, como el agua, CO_2, etanol y glicerina, también atraviesan la membrana por difusión simple. La difusión del agua se realiza mediante el proceso de ósmosis.

2. **Difusión simple a través de canales:** se realiza mediante las denominadas proteínas de canal. Así, entran iones como el Na^+, K^+, Ca^{++}, Cl^-. Las proteínas de canal son proteínas con un orificio o canal interno cuya apertura está regulada, por ejemplo, por ligandos, como ocurre con neurotransmisores u hormonas, que se unen a una determinada región, el dominio receptor de la proteína de canal, que sufre una transformación estructural que induce la apertura del canal.

Difusión facilitada

Permite el transporte de pequeñas moléculas polares, como aminoácidos, monosacáridos, etc., que, al no poder atravesar la bicapa lipídica, requieren que proteínas transmembranales faciliten su paso. Estas proteínas reciben el nombre de proteínas transportadoras o permeasas, que al unirse a la molécula por transportar sufren un cambio en su estructura que arrastra a dicha molécula hacia el interior de la célula (figura 3-6).

Transporte activo

En este proceso también actúan proteínas de membrana, pero éstas requieren energía en forma de ATP para transportar las moléculas al otro lado de la membrana. Se produce cuando el transporte se realiza en contra del gradiente electroquímico. Son ejemplos de transporte activo la bomba de Na^+/K^+ y la bomba de Ca^{++}. La bomba de Na^+/K^+ requiere una proteína transmembranal que bombea 3 moléculas de Na^+ hacia el exterior de la membrana y 2 moléculas de K^+ hacia el interior. Esta proteína actúa contra el gradiente de concentración gracias a su actividad como ATPasa, ya que rompe el ATP para obtener la energía necesaria para el transporte y genera ADP + P. El transporte activo de Na^+ y K^+ tiene gran relevancia fisiológica. Las células animales gastan más de 30% del ATP que producen (y las neuronas más de 70%) para transportar estos iones (figura 3-7).

La bomba de Na^+/K^+ es una proteína que tiene múltiples dominios transmembrana, los cuales dispone en círculo formando un cilindro.

La velocidad del transporte facilitado está limitada por el número de canales disponibles y depende de la saturación, mientras que la velocidad de difusión depende sólo del gradiente de concentración (figura 3-8).

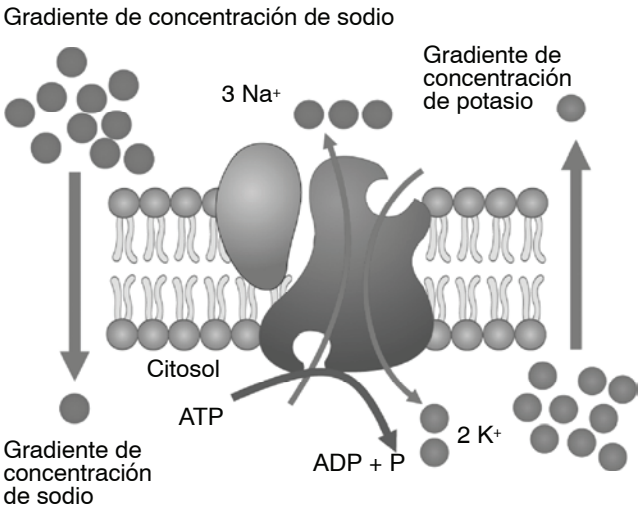


Figura 3-7. Esquema de la bomba Na^+/K^+. Por este mecanismo se bombean 3 Na^+ hacia el exterior y 2 K^+ hacia el interior, con la hidrólisis acoplada de ATP. Las células animales gastan más de 30% del ATP que producen para bombear estos iones.

www.elsolucionario.org

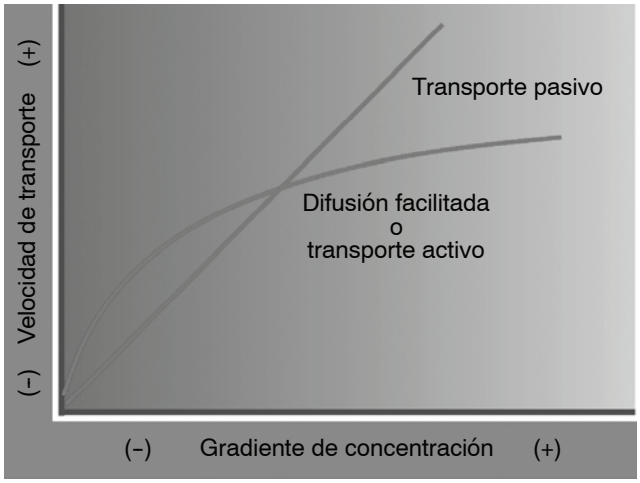


Figura 3–8. Curva de saturación donde se comparan transporte activo, transporte pasivo y difusión facilitada. El transporte pasivo es más eficiente porque no requiere energía.

Transporte de moléculas de elevada masa molecular

Para el transporte de este tipo de moléculas existen cuatro mecanismos principales: endocitosis, exocitosis, transcitosis y potocitosis. En cualquiera de ellos es fundamental el papel que desempeñan las llamadas vesículas revestidas.

Estas vesículas se encuentran rodeadas de filamentos proteicos de clatrina.

Endocitosis

Es el proceso por el que la célula capta partículas del medio externo mediante una invaginación de la membrana en la que se engloba la partícula por ingerir. Se produce la estrangulación de la invaginación originándose una vesícula que encierra al material ingerido. Según la naturaleza de las partículas englobadas, se distinguen diversos tipos de endocitosis.

a. Pinocitosis: implica la ingestión de líquidos y partículas en disolución por pequeñas vesículas revestidas de clatrina (figura 3–9).
b. Fagocitosis: se forman grandes vesículas revestidas, o fagosomas, que ingieren microorganismos y restos celulares (figura 3–9).
c. Endocitosis mediada por receptor: es un mecanismo por el que sólo ingresa la molécula para la cual existe el correspondiente receptor en la membrana, el cual pertenece a la familia de las inmunoglobulinas (Ig). Este mecanismo se observa en linfocitos B (figura 3–9).

Después de que ingresa la molécula a través del proceso de endocitosis mediada por receptor, se sigue una serie de mecanismos para procesar los complejos ligando–receptor:

a. El receptor se recicla y el ligando se degrada.
b. El receptor y el ligando se reciclan.
c. El receptor y el ligando se degradan.
d. El receptor y el ligando son transportados a través de la célula.

Exocitosis

La exocitosis es el proceso por el cual una vesícula se mueve desde el citoplasma hacia la membrana plasmática, desde donde vierte su contenido en el espacio extracelular. Las moléculas que viajan por esta ruta con frecuencia sufren modificaciones químicas; mediante este mecanismo, las células son capaces de eliminar sustancias sintetizadas por ellas mismas (secreción), o bien sustancias de desecho. La membrana de la vesícula que se añade a la membrana plasmática con la exocitosis

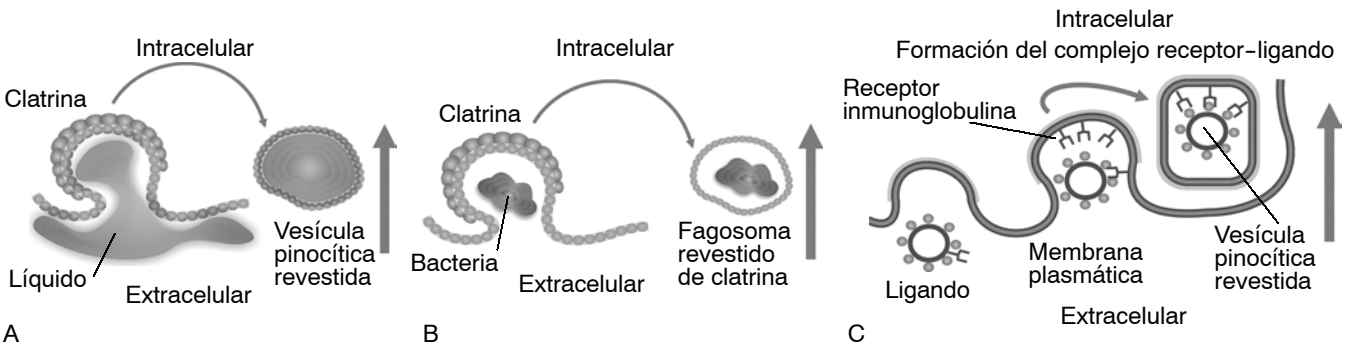


Figura 3–9. Endocitosis. ***A.*** Pinocitosis. Es la ingestión de líquidos y partículas en disolución por pequeñas vesículas revestidas de clatrina. ***B.*** Fagocitosis. Se forman fagosomas que ingieren microorganismos y detritus celulares. ***C.*** Endocitosis mediada por receptor. Es un mecanismo mediado por anticuerpos de membrana.

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

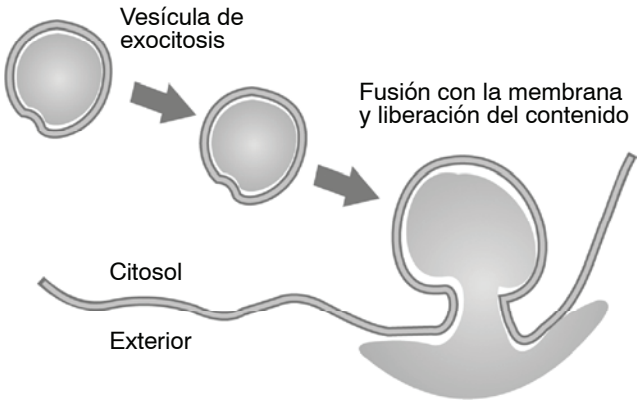


Figura 3-10. Esquema de exocitosis. En este proceso, una vesícula se mueve desde el citoplasma hacia la membrana plasmática, desde donde vierte su contenido en el espacio extracelular. La membrana de la vesícula que se agrega a la membrana plasmática con la exocitosis retorna al compartimento citoplasmático con la endocitosis.

retorna al compartimento citoplasmático mediante un proceso de endocitosis (figura 3-10). Este proceso se lleva a cabo por dos mecanismos:

a. **Secreción regulada:** en las células especializadas, como las células endocrinas y exocrinas, y las neuronas, concentran las proteínas de secreción y las almacenan temporalmente en vesículas secretoras dentro del citoplasma. En este caso, la secreción tiene que producir un fenómeno regulador (un estímulo hormonal o nervioso).
b. **Secreción constitutiva:** las sustancias destinadas a la exportación se envían en forma continua hacia la membrana plasmática en vesículas de transporte. Este mecanismo está presente en todas las células y carece de regulación.

En toda célula existe un equilibrio entre la exocitosis y la endocitosis, para mantener la superficie de la membrana plasmática y que quede asegurado el volumen celular (figuras 3-9 y 3-10).

Transcitosis

Es el conjunto de fenómenos que permiten a una sustancia atravesar todo el citoplasma celular de un polo a otro de la célula. Implica el doble proceso endocitosis-exocitosis.

Es propio de células endoteliales que revisten los capilares sanguíneos, transportándose así las sustancias desde el medio sanguíneo hasta los tejidos que rodean a los capilares (figura 3-11).

Potocitosis

Este proceso es un tipo de endocitosis especial, ya que se tiene que acumular un cierto número de moléculas que van a ser endocitadas para que se inicie el proceso.

Endosomas

Los endosomas pueden ser organelos citoplasmáticos estables o estructuras temporales formadas como consecuencia de la endocitosis; se dividen en tempranos y tardíos.

Los endosomas tempranos están restringidos a una región del citoplasma cercana a la membrana celular. Sin embargo, una gran cantidad de vesículas originadas en los endosomas tempranos viajan hacia las estructuras más profundas del citoplasma, conocidas como endosomas tardíos, los cuales se convierten en lisosomas.

Los endosomas que se convertirán en lisosomas reciben enzimas lisosómicas neosintetizadas que se orientan a través del receptor de manosa-6-fosfato.

Los endosomas tempranos se encuentran en el citoplasma más periférico, mientras que los endosomas tardíos se ubican cerca del aparato de Golgi y del núcleo. Los endosomas tempranos tienen una estructura tubulovesicular y la luz está subdividida en compartimentos. Su medio interno es apenas más ácido que el citoplasma de la célula (pH 6.2 a 6.5); en cambio, los endosomas tardíos o lisosomas poseen una estructura más compleja y su pH es más ácido, con un promedio de 5.5.

La función principal de los endosomas tempranos es clasificar y reciclar las proteínas incorporadas por los mecanismos de endocitosis. El destino del complejo ligando-receptor incorporado depende de la capacidad de clasificar y reciclar del endosoma temprano.

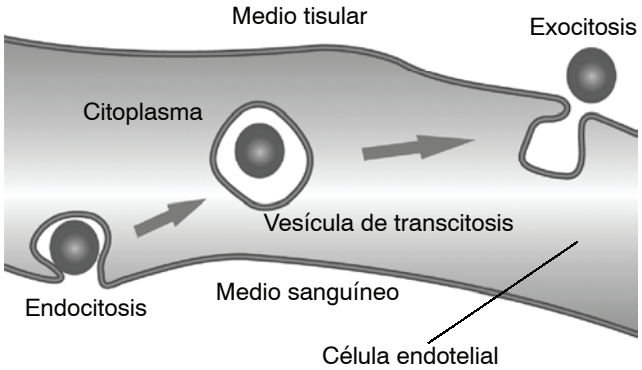


Figura 3-11. Esquema de la transcitosis. Mediante este mecanismo, las moléculas atraviesan todo el citoplasma celular de un polo a otro de la célula. Implica el doble proceso endocitosis-exocitosis.

www.elsolucionario.org

RECONOCIMIENTO CELULAR

Gracias a moléculas situadas en la parte externa de la membrana, que actúan como receptoras de moléculas, la célula responde ante los cambios ambientales a los que está sometida; el éxito de estos mecanismos asegura que el organismo sobreviva a sus cambiantes circunstancias ambientales. La supervivencia de todos los organismos exige que sus células sean capaces de responder adecuadamente a los estímulos (cambios ambientales de cualquier tipo).

En organismos multicelulares, estos mecanismos forman redes de comunicación más complejas, que garantizan que cada célula funcione y responda a una diversidad aún mayor de estímulos, y que lo haga coordinadamente con las otras células del organismo. Por esta comunicación entre células, el organismo mantiene una funcionalidad como entidad unitaria. De esta red de comunicación, según el tipo celular de que se trate, dependen funciones tan importantes como el desarrollo embrionario, la proliferación y diferenciación celular, las respuestas al estrés, la percepción sensorial, el movimiento (por contracción muscular), la secreción de una glándula, la respuesta inmunitaria, la regulación metabólica, la apoptosis, etc.

Las señales y las respuestas mediadoras de la comunicación entre células pueden ser de naturaleza química, eléctrica y químico-eléctrica. La señalización a través de mensajeros químicos consiste en la secreción de moléculas que deben ser reconocidas específicamente por receptores en la célula blanco. A diferencia de las señales eléctricas y químico-eléctricas, las señales puramente químicas deben difundirse, o aun viajar por el torrente sanguíneo, hasta encontrar su célula blanco. Esto ocasiona que, en general, la respuesta a las señales químicas sea lenta y de mayor duración que la evocada por señales eléctricas y químico-eléctricas. El estudio de este último tipo de señales, empleadas por células excitables nerviosas y musculares, se enmarca dentro de la electrofisiología.

Sin embargo, un evento eléctrico como la despolarización de una neurona también genera frecuentemente respuestas químicas en la célula blanco, que afectan a largo plazo su función. La memoria es el resultado de este tipo de modificación funcional de circuitos neuronales específicos.

Las áreas de investigación comprendidas en el campo de la transducción de señales químicas comprenden el estudio de la síntesis y liberación de las moléculas mensajeras (ligandos); su transporte hasta la célula blanco; su detección por receptores específicos en la célula blanco; la generación por parte del complejo receptor-ligando de una segunda señal, ahora exclusivamente intracelular (la "transducción" propiamente dicha); cómo estos segundos mensajeros afectan respuestas bioquímicas inmediatas en el metabolismo celular y cómo ajustan la expresión genética de la célula blanco para mantener respuestas de largo plazo, y, finalmente, cómo se disipa la señal. Estos cambios en la expresión genética usualmente incluyen la producción de otras señales que, a su vez, modificarán la actividad de otras células. Esta concatenación de señales y respuestas explica cómo las células de un organismo pluricelular mantienen una cohesión funcional armónica. La transducción de señales se ha convertido en una de las áreas de investigación más activas, debido no sólo a su participación en prácticamente toda la fisiología del organismo, sino también al hecho de que su mal funcionamiento generalmente conduce a estados patológicos. Enfermedades tan graves como la diabetes, hipertensión arterial y cáncer son resultado del mal funcionamiento de los mecanismos de señalización. Una comprensión total de estos mecanismos, en la salud y enfermedad, proporcionará nuevas terapéuticas más efectivas para estos padecimientos.

Los mensajeros químicos son moléculas con características químicas muy diversas: hay péptidos, proteínas, complejos proteicos, moléculas pequeñas derivadas de aminoácidos, compuestos lipídicos derivados del ácido araquidónico y compuestos esteroides derivados del colesterol.

Según sus propiedades de solubilidad y localización de sus receptores, las moléculas mensajeras se clasifican en:

1. **Moléculas hidrofílicas:** son aquéllas que no pueden difundirse a través de la membrana plasmática e interaccionan con receptores localizados en la superficie celular; por ejemplo, péptidos como la insulina, o proteínas como la hormona de crecimiento; pequeñas moléculas cargadas como la acetilcolina y otras derivadas de algunos aminoácidos como la epinefrina, la histamina, la serotonina y la dopamina, algunas de las cuales funcionan como hormonas o como neurotransmisores. Muchas de estas moléculas modifican la actividad de una o más enzimas ya presentes en la célula. El efecto de la molécula ligada a la superficie celular es casi inmediato, pero persiste sólo por un periodo pequeño; sin embargo, el efecto de algunos factores tróficos se puede extender por varios días, pues también puede regular los patrones de expresión de la célula blanco.

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

2. **Moléculas lipofílicas:** son aquéllas capaces de difundirse a través de la membrana plasmática e interaccionar con receptores del citosol o del núcleo; por ejemplo, las hormonas esteroides, la tiroxina y los derivados del ácido retinoico. Estas hormonas interactúan con receptores intracelulares, formando complejos capaces de incrementar o disminuir la transcripción de genes específicos; estos complejos también contribuyen a la estabilidad de ciertos RNA mensajeros. Estos compuestos ejercen su efecto por horas y días, y contribuyen al crecimiento y diferenciación de células y tejidos específicos.
3. **Moléculas lipofílicas con receptores de superficie,** como las prostaglandinas, moléculas derivadas del ácido araquidónico, de las cuales hay por lo menos 16 tipos distintos. Varias prostaglandinas actúan como mediadores locales. Ciertos miembros de este grupo provocan la agregación plaquetaria y desempeñan un papel importante en el fenómeno de la coagulación, por lo que intervienen en el curso de enfermedades vasculares y reparación de heridas.

Según la distancia que hay entre la célula productora y la célula blanco sobre la que actúan, las moléculas señal también se clasifican en:

1. **Moléculas de señalización endocrina:** son aquéllas que actúan sobre células blanco distantes del sitio u órgano de síntesis. A este grupo pertenecen hormonas como la de crecimiento, insulina, progesterona, tiroxina, etc. En los animales, las hormonas son llevadas a través del torrente sanguíneo desde su sitio de síntesis hasta la célula blanco, y la distancia en la que esta comunicación ocurre varía desde unos cuantos micrómetros hasta varios metros.
2. **Moléculas de secreción paracrina:** son aquellas moléculas liberadas por una célula y que afectan sólo a las células que se encuentran en la proximidad inmediata; un ejemplo de la señalización paracrina es la neurotransmisión sináptica, donde se transmite un impulso eléctrico de una célula nerviosa a otra, o de una célula nerviosa a una célula muscular por medio de efectores químicos.
3. **Moléculas de secreción autocrina**: son aquéllas involucradas en la autocomunicación celular, donde las células responden a moléculas que ellas mismas producen. Varios factores tróficos actúan de esta manera, y muchos cultivos celulares secretan los factores que estimulan su propio crecimiento y proliferación, lo que conduce a la aparición de masas tumorales. De manera similar a la señalización paracrina, la distancia en la que ocurre esta comunicación se encuentra en el rango de los micrómetros.
4. **Moléculas de secreción yuxtacrina:** son proteínas ancladas en la superficie de la membrana plasmática de una célula que pueden interaccionar con receptores en la superficie de la célula adyacente.
5. **Moléculas de secreción citocrina:** esta secreción es típica de los melanocitos, los cuales secretan la melanina a través de sus prolongaciones dendríticas, directamente sobre las células epiteliales.

Receptores

La mayoría de los receptores identificados han sido descritos con base en su capacidad para unirse a ligandos específicos. La detección y cuantificación de los receptores de membrana se realizó en la década de 1960. La respuesta celular a una molécula mensajera, designada como ligando (hormona, citosina, factor trófico o neurotransmisor), depende de su enlace o interacción con un receptor específico para ese ligando. Generalmente, el receptor es una proteína que puede estar localizada en la superficie de la célula blanco, el citosol o el núcleo. Las interacciones o uniones ligando-receptor son de alta afinidad, no covalentes, y ocasionan un cambio conformacional en el receptor, el cual inicia una serie de reacciones que conducen a un cambio en la función celular.

El ligando no se metaboliza en productos útiles, no es intermediario en ninguna actividad celular y carece de actividad enzimática. La única función del ligando parece ser la de cambiar ciertas propiedades del receptor que indican en el interior de la célula la presencia de un ligando específico en el ambiente extracelular. En algunas células blanco, la degradación o modificación del ligando puede modificar o terminar la respuesta al mensajero. Uno de los efectos más comunes de la unión de ligandos a muchos tipos de receptores de superficie es el aumento o disminución, generalmente de poca duración, de la concentración de segundos mensajeros. Entre los segundos mensajeros más importantes están: 3',5'-AMP cíclico, 3',5'-GMP cíclico, el 1,2-diacilglicerol (DAG), inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3), el óxido nítrico (NO) y el Ca^{2+}.

La respuesta de una célula o tejido a mensajeros específicos está determinada por los receptores que posee

www.elsolucionario.org

y por el estado metabólico o de diferenciación celular, el cual pudo haber sido modificado previamente por otros ligandos.

Por esta razón, el mismo receptor puede estar presente en diferentes estirpes celulares, y el enlace de su ligando puede desencadenar distintas respuestas en ellas.

Existen cuatro grandes grupos o clases de receptores localizados en la membrana celular:

1. **Receptores accesorios o correceptores:** son moléculas localizadas en la superficie celular capaces de unir ligandos con alta afinidad y especificidad, pero incapaces de transducir por sí mismas una señal al interior de la célula. Su presencia regula la unión de los ligando a sus auténticos receptores de señalización y con ello determina la actividad del ligando en cuestión. Uno de los receptores mejor estudiados es el de proteoglicanos de heparansulfato. Este tipo de glicoproteínas están compuestas por una proteína medular, a la cual se unen covalentemente glicosaminoglicanos que se unen al factor de crecimiento fibroblástico (FGF) y lo presentan a sus receptores de señalización, los cuales son proteínas transmembranales con actividad de tirosina cinasa. A diferencia de otros receptores y correceptores, la parte funcional de este correceptor es el heparansulfato y no el polipéptido. Para evocar los efectos a concentraciones fisiológicas, el FGF requiere la presencia de los heparansulfatos, que favorecen la interacción ligando–receptor. Los correceptores no sólo aumentan la concentración neta del ligando al receptor de señal, sino que también propician cambios conformacionales en el ligando, receptor o en ambos.
2. **Receptores con actividad enzimática:** estos receptores se caracterizan por presentar un domino citoplasmático con actividad enzimática, que por lo general incluye proteincinasas, proteinfosfatasas y guanilatociclasas.
3. **Receptores sin actividad enzimática asociados a proteínas citosólicas:** estos receptores son glicoproteínas transmembranales con regiones extracelulares que se unen al ligando y regiones citoplasmáticas carentes de actividad catalítica; la función de las regiones intracelulares de estos receptores es servir de sitios de anclaje para otras proteínas citosólicas transductoras de señal. Los receptores de las citocinas pertenecen a esta categoría. Las citocinas son importantes polipéptidos producidos por leucocitos y células hematopoyéticas, y que son reguladores centrales de la respuesta inmunitaria y la inflamación. Las citocinas conforman un grupo heterogéneo que incluye a interleucinas (IL), interferones (INF), factores de necrosis tumoral (TNF), eritropoyetina, hormona de crecimiento, prolactina, etc.
4. **Receptores acoplados a proteínas G:** este grupo comprende a más de 300 miembros conocidos a nivel de secuencia primaria. Son receptores de membrana que consisten en una cadena polipeptídica de aproximadamente 450 residuos, cuya estructura posee siete hélices transmembranales unidas por asas alternadas intracelulares y extracelulares. El extremo amino terminal se encuentra en el lado extracelular de la membrana y el carboxilo terminal en el lado citosólico; este último contiene secuencias que corresponden a sitios consenso de fosforilación por proteincinasas. Estos receptores se encuentran acoplados a proteínas G, las cuales pertenecen a la superfamilia de proteínas con actividad de GTPasas. Esta familia incluye dos grandes grupos de proteínas que participan en distintas vías de la transducción de señales:
   - **a.** Proteínas G heterotriméricas, cuyos componentes son una subunidad alfa, responsable de la unión e hidrólisis de GTP, la subunidad beta y la gamma, que funcionalmente actúan siempre juntas.
   - **b.** Proteínas G de bajo peso molecular monoméricas, como *Ras,* que participa en las vías de transducción y proliferación celular; *Rab,* en la movilización intracelular de vesículas, y *Rho,* que regula la arquitectura celular, modificando elementos del citoesqueleto de actina ante diversos estímulos extracelulares.

Las proteínas G son una familia de proteínas que tienen afinidad especial por los nucleótidos de guanina y desempeñan un papel importante en la transducción de señales de las células eucariotas.

En 1971 se observó que el guanosín trifosfato (GTP) era necesario para la activación de la adenilatociclasa de los agonistas adrenérgicos beta, y posteriormente en esa misma década se descubrió el motivo de esta necesidad: las proteínas de membrana que unen GTP interaccionan con los sistemas receptores que inhiben o activan la adenilatociclasa.

Estas proteínas acoplan a más de 100 receptores distintos para diversas proteínas, como la adenilatociclasa, la guanilatociclasa y algunos tipos de canales iónicos.

Las proteínas G heterotriméricas están asociadas a la cara interna de la membrana plasmática, funcionan

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

como componentes acoplables pasando información de los receptores a las enzimas o sistemas efectores encargados de producir segundos mensajeros. Las proteínas G heterotriméricas constan de tres subunidades alfa, beta y gamma. La subunidad alfa es la más grande y está involucrada en la unión al nucleótido de guanina (GDP o GTP); cuando tiene GDP unido es inactiva y se encuentra formando parte del trímero. En una reacción catalizada por el receptor (en la que el ligando o agonista se enlaza al dominio extracelular del receptor), el GDP es intercambiado por GTP; este enlace ocasiona que la subunidad alfa se disocie del dímero beta-gamma, y al difundir lleva el mensaje hacia alguna proteína blanco corriente abajo en los eventos de transducción. Algunas subunidades G activan la adenilatociclasa localizada en la membrana plasmática, la cual produce AMPc; éste, a su vez, activa varias cinasas dependientes de AMPc, las que también fosforilan a muchas proteínas blanco involucradas en respuestas celulares, activándolas o inhibiéndolas (figura 3-12).

Se tratará de describir sus funciones en relación con los receptores adrenérgicos.

Cuando un agonista se une a su receptor, este receptor adquiere una conformación que le permite interactuar con una determinada proteína G que se encuentra en estado inactivo, y se genera un complejo transitorio. El acoplamiento del receptor activado con la región amino terminal de G-alfa induce a su vez cambios conformacionales que conducen a la liberación de GDP. El GDP se intercambia por un GTP que se une a la proteína G y gana un grupo fosfato; el complejo GTP–alfa-beta-gamma resultante se disocia en GTP–alfa y GTP beta-gamma. La porción GTP–alfa es el fragmento que participa en la activación o inhibición del efector molecular, que puede ser la adenilciclasa, o bien puede participar en forma directa en la apertura del canal iónico. Posteriormente, la subunidad α facilita que el GTP pierda un fosfato por su actividad de GTPasa, lo cual resulta en la reasociación GDP–alfa-beta-gamma cerrándose así el ciclo. Se han identificado varios tipos de subunidades alfa: la $alfa_s$ estimula la adenilciclasa formándose un segundo mensajero AMPc; la $alfa_i$ inhibe la adenilciclasa y la $alfa_o$ estimula la cascada del fosfoinositol, formándose segundos mensajeros, que son el diacilglicerol (DAG) y el inositol trifosfato (IP_3).

Cada tipo de proteína G, al ser activada por sus receptores, conecta una o varias moléculas blanco, incluyendo algunos canales iónicos de calcio y potasio, la adenilatociclasa, la guanilatociclasa, la fosfolipasa C (enzima que libera inositol a partir de lípidos de membrana), fosfolipasa A_2 (enzima que libera ácido araquidónico, un precursor de prostaglandinas y leucotrienos a partir de

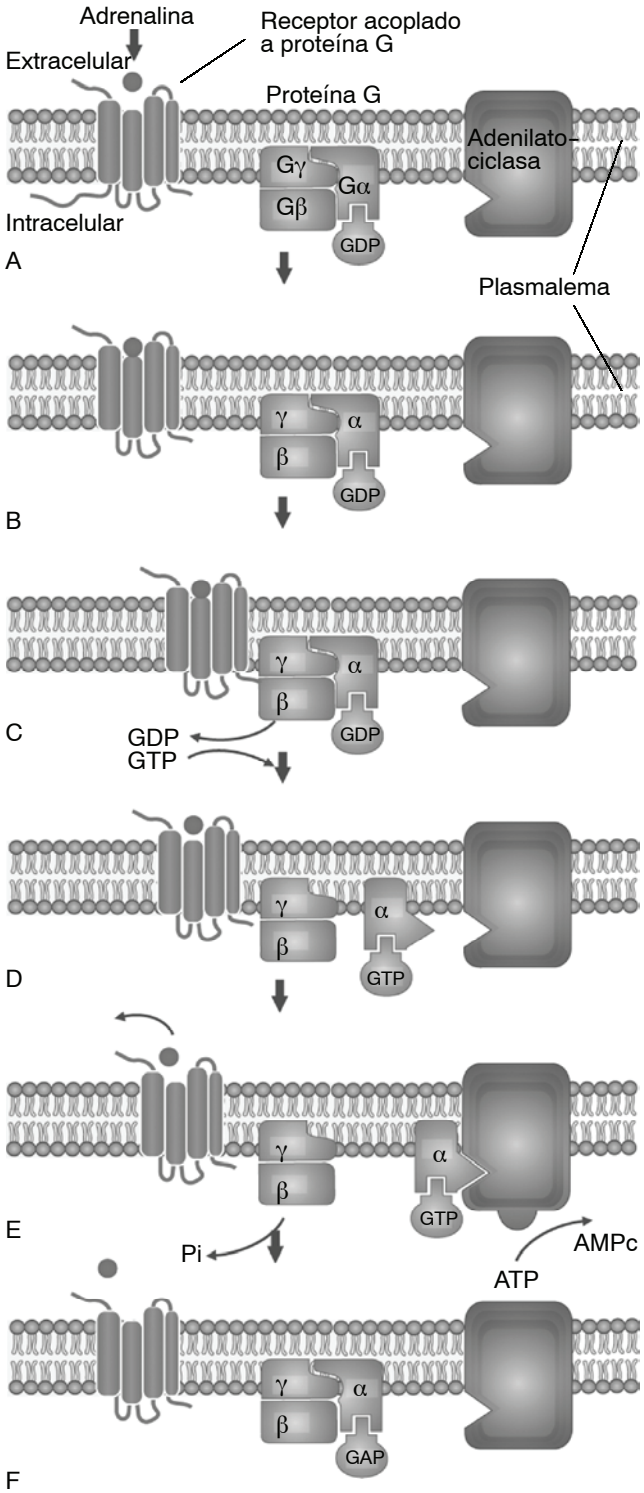


Figura 3-12. Esquema de la activación de la adenilatociclasa por epinefrina a través de su receptor y proteínas G triméricas. ***A.*** Cuando la epinefrina se une a su receptor. ***B.*** La subunidad alfa de la proteína G intercambia GDP por GTP. ***C, D.*** Esto provoca su activación y disociación trimérica. Su asociación con la adenilatociclasa activa a esta enzima. ***E, F.*** Cuando la subunidad alfa hidroliza GTP a GDP se inactiva y reconstituye el trímero alfa, beta y gamma.

www.elsolucionario.org

lípidos de membranas), fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos, activación de cinasas como *RAF*, etc.

RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO (RE)

Deriva su nombre del latín *reticulum,* red y del griego *endon,* dentro; *plasma,* del citoplasma. El RE presenta dos regiones diferentes tanto morfológica como funcionalmente: el retículo endoplasmático liso (REL) y retículo endoplasmático rugoso (RER). En ambos casos, el RE consiste en un intrincado sistema de estructuras membranosas interconectadas entre sí. Más específicamente, el RER contiene una estructura en forma de sacos aplanados, mientras que el REL consiste en una estructura tubular. La diferencia morfológica más evidente entre ambas regiones es la presencia de ribosomas sobre la superficie externa de la membrana celular del RER y su ausencia en el REL. Juntos se encuentran limitando un espacio intracelular llamado lumen. La región intermedia o de transición entre el REL y el RER presenta una baja proporción de ribosomas, y se relaciona con el empaquetamiento en vesículas de productos de membrana para el transporte hacia el aparato de Golgi. El RE, a diferencia del aparato de Golgi, se mantiene intacto a través de todo el ciclo celular, durante la mitosis migra y se acumula en los polos mitóticos de manera dependiente de los microtúbulos, mientras que el aparato de Golgi se fragmenta en vesículas durante la profase.

Provee a la célula de una gran superficie para la organización espacial de reacciones químicas y síntesis de moléculas como proteínas, hormonas esteroides, fosfolípidos y ácidos grasos. También es el encargado de secuestrar y almacenar Ca^{++}, además de realizar reacciones de desintoxicación de la célula. El RER es muy abundante en células secretoras, ya que es el punto de entrada de la ruta de secreción donde las proteínas secretoras encuentran la maquinaria necesaria para el plegamiento, control de calidad y señalización (cambios postraduccionales).

La ruta de las proteínas secretoras se inicia con la inserción de una preproteína "señalizada" en el lumen del RER. El procesamiento postraduccional de las proteínas en la luz del RER como parte del proceso de plegamiento es la sulfatación o formación de puentes disulfuro y la N-glicosilación; en este proceso, la formación de la glicoproteína depende parcialmente de la deglicosilación de un oligosacárido transferido de un derivado de dolicol difosfato.

Sólo las proteínas que pasan por un proceso de selección especial son transportadas a los organelos o compartimentos de destino final. El control de calidad se lleva a cabo una vez que la preproteína es transferida a una maquinaria de transportación de proteínas en la membrana del RER, donde se modifica para adquirir la estructura terciaria o cuaternaria definitiva. Sin embargo, cuando el plegamiento o cualquier otro procesamiento de maduración de la molécula no es adecuado, es también el sitio de control de calidad donde se interrumpe el paso hacia el aparato de Golgi; las proteínas erróneamente procesadas son enviadas y degradadas por el proteasoma. El control de calidad mejora la eficiencia en el plegamiento y previene efectos peligrosos debidos a un plegamiento incorrecto e incompleto.

La mayoría de las proteínas transportadas hacia el espacio extracelular tienen una señal en el extremo amino terminal (N-terminal) o secuencias de señalización. En el transporte de proteínas no clásico, las proteínas que carecen de la secuencia del péptido señal son exportadas por una vía independiente de la ruta clásica RER-Golgi.

Retículo endoplasmático liso o agranular (REL)

El REL representa una proporción menor del total de RE, aunque en células especializadas ocupa grandes extensiones de citoplasma, como en las células secretoras de hormonas esteroideas en la corteza suprarrenal. Se presenta como una serie de sacos o bolsas aplanadas y túbulos membranosos, cuya localización y extensión es variable, y depende de la actividad metabólica particular de la célula. La membrana que lo recubre es muy similar en composición química, ultraestructura y dimensiones a la membrana plasmática, pero presenta asociadas una gran cantidad de enzimas para sus funciones específicas (figura 3-13).

Debido a que el REL es el principal sitio de síntesis de lípidos, se encuentra muy desarrollado en células que producen grandes cantidades de estas moléculas, como el hígado, la glándula mamaria activa y las células intestinales. En los pulmones de mamíferos, el surfactante, una compleja mezcla de lípidos (90%) y proteínas específicas (10%), previene el colapso alveolar y mantiene la interfase aire-líquido. Los fosfolípidos que forman esta mezcla son producidos en el REL de las células alveolares tipo II o neumocitos tipo II, y se almacenan en cuerpos membranosos característicos, denominados cuerpos lamelares. Existe un considerable interés biotecnológico en la manipulación y almacenamiento de lípidos tanto desde el punto de vista médico como agronómico.

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

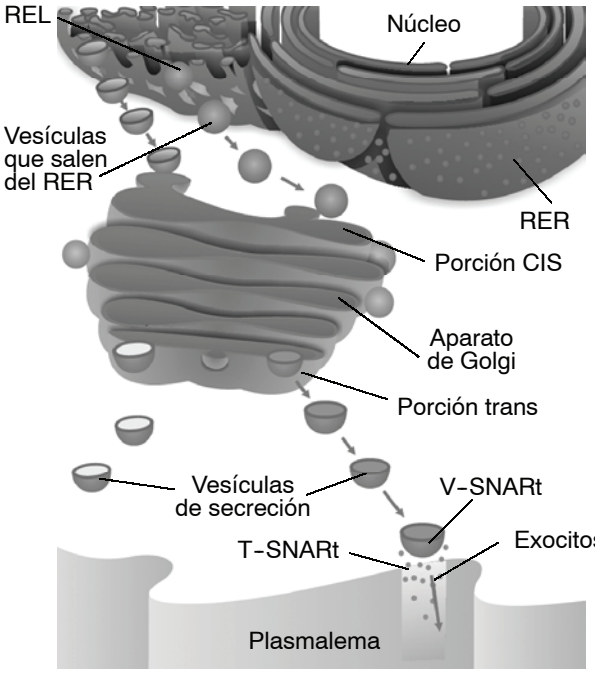


Figura 3-13. Imagen representativa del RER y el REL de una célula secretora. El REL, a diferencia del RER, no presenta ribosomas unidos a su membrana.

Por ejemplo, en seres humanos, está involucrada una disfunción en el almacenamiento de lípidos neutros en enfermedades como obesidad, aterosclerosis y diabetes tipo 2.

Desde el punto de vista agronómico, el interés está basado en la producción de plantas que produzcan frutos o semillas con alto contenido lipídico.

El colesterol está presente en las células eucariotas, pero se encuentra distribuido de diferente manera; mientras que la membrana del RE es pobre en colesterol, la membrana plasmática, y en particular las capas de mielina, están enriquecidas con este lípido. Las cadenas acilo fijan la molécula de lípido incompleta a la membrana, mientras que se van añadiendo las cabezas polares para completar el fosfolípido. Esto se lleva acabo en el lado citosólico del REL. Existe un mecanismo para transferir algunos de los fosfolípidos generados en la cara citosólica a la cara interna del REL; este mecanismo se llama movimiento de moléculas por *flip-flop,* y es llevado a cabo gracias a la actividad de una enzima denominada flipasa, que es capaz de catalizar la transferencia de algunos fosfolípidos a través de la bicapa hasta 10^5 veces más rápido de lo normal. Aunque termodinámicamente este mecanismo es desfavorable, se realiza debido a estas translocasas activas que no requieren energía en varios puntos de la membrana del RE. La flipasa tiene preferencia por fosfolípidos que contienen colina más que por los que contienen etanolamina, serina o inositol, de tal manera que produce una membrana con distribución asimétrica de los fosfolípidos en cada una de sus capas. Durante el tráfico entre membranas del RE y el aparato de Golgi, los túbulos se extienden y dividen en los extremos terminales de los organelos para formar vesículas intermediarias de transporte que eventualmente se fusionan al organelo destinatario para dirigir su contenido de membrana recién sintetizada hacia su destino final.

El Ca^{++} se acumula en el REL a través de la función de una bomba, perteneciente a la familia de las ATPasas dependientes de Ca^{++}. En músculo estriado, por ejemplo, en condiciones de reposo, la concentración de Ca^{++} en el REL es considerablemente más alta (10 a 100 M) que en el citoplasma (100 a 300 nM). Con base en varios estudios se ha sugerido que este gradiente de Ca^{++} se mantiene gracias a la presencia y actividad de la bomba de Ca^{++} dependiente de ATP, la **s**arco(**e**ndo)plasmática **r**etículo **C**a^{++} **a**denosín trifosfatasa (SERCA ATPasa) en la membrana del REL, la cual secuestra Ca^{++} y mantiene la relajación muscular.

En el proceso de envejecimiento se observa un decremento en la masa muscular, fuerza y velocidad de contracción del músculo esquelético. Estudios bioquímicos recientes aportan información acerca de los mecanismos patológicos que ocurren por los cambios relacionados con el envejecimiento en relación con el flujo de Ca^{++} y el proceso excitación-relajación. El número de bombas SERCA no se afecta con la edad, y se sugiere que la patogénesis se debe a la disminución en la estabilidad conformacional de la bomba SERCA. La SERCA ATPasa es una proteína de vida larga con una disminución en la tasa de recambio en el músculo envejecido, lo que estaría incrementando el potencial de modificaciones postraduccionales de la proteína; esto, aunado a alteraciones debidas a cambios en la regulación dependiente de la fosforilación, estaría contribuyendo a desacoplamiento del transporte de Ca^{++} y a la disminución de las células musculares. Se conoce una familia de genes para la SERCA: SERCA1, SERCA2 y SERCA3; cada uno tiene dos isoformas.

La desintoxicación que se realiza en el REL es un proceso que se lleva a cabo en dos etapas: la primera incluye oxidación, reducción, hidratación, hidrólisis, isomerización y otras reacciones específicas. En general, los productos de reacción de la fase I son químicamente más reactivos que el compuesto original, y al parecer esta fase tiene como objetivo la creación de especies reactivas, más que el verdadero proceso de desintoxicación en la fase II, el cual consiste en reacciones de glucoronidación. En esta fase, un azúcar del uridindifos-

www.elsolucionario.org

fato (UDP)-ácido glucorónico unido covalentemente al xenobiótico o endobiótico facilita su eliminación mediante la orina o la bilis.

Las reacciones de conversión de estos compuestos a moléculas menos tóxicas son catalizadas por oxidasas, que incluyen la p450, localizadas en la membrana del REL; estas enzimas, que carecen de sustratos específicos, son capaces de oxidar miles de compuestos hidrofóbicos convirtiéndolos en hidrofílicos.

Otras funciones del REL son:

1. **Biogénesis de membrana:** el REL sintetiza los fosfolípidos de membrana que provienen del interior del RE para reemplazar la envoltura nuclear, como parte del reciclamiento del aparato de Golgi, para formar nuevos lisosomas y mitocondrias o para reemplazar su propia membrana. La biogénesis de endomembranas requiere la síntesis y el ensamblado de dos capas de fosfolípidos, glicolípidos y colesterol, además de la inserción de proteínas membranales.
2. **Biosíntesis de los lípidos de membrana:** almacena lípidos en los microdominios del RE que contienen las enzimas involucradas en la biosíntesis de moléculas lipídicas. Los mecanismos por los cuales se generan los cuerpos lipídicos son:
   a. La mayoría de los cuerpos lipídicos se acumulan mediante proteínas de superficie específicas que se encuentran en el RE, como es el caso de la apolipoproteína, la perilipina/ADRP (proteína relacionada con la diferenciación de adipocitos), la butirofilina (proteína que está más asociada con la bicapa lipídica que con los cuerpos lipídicos en sí), etc. Durante la biogénesis, los pequeños cuerpos lipídicos nacientes sufren una serie de fusiones altamente reguladas y pueden alterar sus proteínas de superficie antes de alcanzar su tamaño y composición madura. Los cuerpos lipídicos que están dirigidos hacia el citosol pueden tener una ruta preestablecida, mientras que los que se dirigen hacia el lumen del RE requieren la cotraducción de proteínas específicas, como la apolipoproteína B, y de proteínas chaperonas.
   b. El sitio de ensamblado de cuerpos lipídicos se localiza en regiones especializadas de RE, donde se agrupan las enzimas con función biosintética.
3. **Desintoxicación:** el REL es la subestructura celular involucrada en la desintoxicación de drogas, alcohol, barbitúricos y otros xenobióticos potencialmente peligrosos en algunos órganos como el hígado y pulmón. Cuando grandes cantidades de compuestos tóxicos están en circulación, se observa un gran incremento del REL, pero una vez que la droga ha sido eliminada del sistema el REL involuciona en un periodo de tiempo muy corto, como resultado de la actividad de los lisosomas.
4. **Secuestro del calcio (Ca^{++}):** el Ca^{++} activa la contracción muscular y es un segundo mensajero de hormonas, que regulan el metabolismo y la expresión de genes. Las células musculares responden a una variedad de estímulos por la movilización del Ca^{++}. El REL de células musculares se encuentra altamente especializado, desarrolla un papel preponderante en el ciclo de contracción-relajación muscular y recibe el nombre de retículo sarcoplasmático, pero, no sólo en estos tipos celulares se presenta esta especialización. En neurona coexisten el RER y el REL en los cuerpos celulares y en las regiones proximales de los axones, pero en las terminales especializadas que incluyen terminaciones de axones, conos de crecimiento y espinas dendríticas existe principalmente el REL. Se ha sugerido que la presencia de esta estructura membranosa en ambas células (musculares y nerviosas) tiene como función controlar los niveles citoplasmáticos de Ca^{++} libre.
5. **Síntesis de hormonas esteroides en células endocrinas y de la corteza suprarrenal:** las enzimas involucradas en la síntesis de esteroides a partir de colesterol se encuentran en el REL. Así, los tipos celulares que presentan un REL muy desarrollado son los de las glándulas suprarrenales y las células de Leydig. Ambos tipos celulares responden a estímulos diversos sintetizando hormonas esteroides.

Retículo endoplasmático rugoso (RER) o granular

El RER presenta una imagen semejante a la del REL, es decir, bolsas aplanadas y túbulos membranosos interconectados, pero se diferencia del anterior en que sus membranas están cubiertas, en su superficie externa, por ribosomas y polisomas (polirribosomas). Los ribosomas y los polisomas están adheridos a la membrana por su subunidad mayor. Muchos tipos celulares contienen en el citoplasma una sustancia que adquiere un intenso color con los colorantes básicos; en algunas células, este componente celular confiere una difusa

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

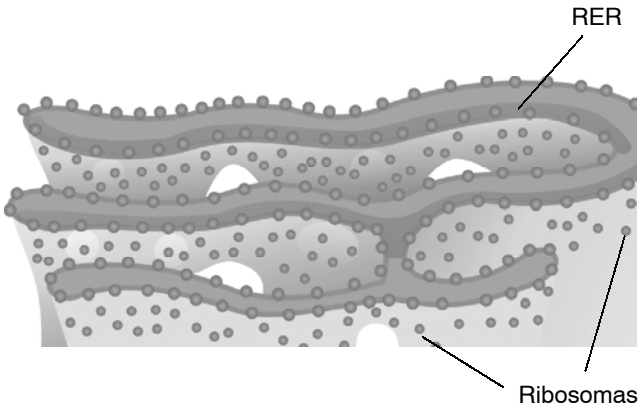


Figura 3-14. Dibujo esquemático del ergastoplasma (RER) de una célula secretora de proteínas. Se observan los ribosomas unidos a la membrana externa del organelo. Los ribosomas se ven como numerosos puntos oscuros adheridos a las capas paralelas de membrana.

basofilia al citoplasma, mientras que en otras se forman zonas basófilas aisladas.

Este material basófilo se denomina ergastoplasma (su nombre deriva del griego *ergon,* trabajo, y del latín *rete,* red), y en las neuronas, sustancia o corpúsculos de Nissl (figura 3-14).

El material basófilo del citoplasma se identificó como un ácido ribonucleico (RNA), dado que se demostró que absorbe la luz ultravioleta a 260 nm, y que se elimina mediante el tratamiento con la enzima ribonucleasa (ribosomas).

La extensión y distribución mayor del RER es variable y depende de la actividad metabólica particular de la célula.

El RER es abundante en células secretoras, y es el punto de entrada a la ruta de secreción donde las proteínas precursoras encuentran la maquinaria necesaria para su glicosilación, sulfatación, fosforilación y plegamiento.

El RER tiene un papel importante en la biosíntesis de proteínas; sus membranas son el sitio de producción de todas las proteínas transmembranales y de secreción para la mayoría de los organelos celulares, incluyendo RE, aparato de Golgi, lisosomas, endosomas, vesículas de secreción y membrana plasmática.

Las proteínas precursoras son dirigidas desde el citosol a la membrana del RER, e insertadas o transportadas a través de la membrana al lumen durante o inmediatamente después de su síntesis en el proceso conocido como translocación.

Por otro lado, el RER es también el sitio de control de calidad en donde las proteínas erróneamente procesadas son enviadas al citoplasma y degradadas en los proteasomas.

Transporte de proteínas precursoras desde el citosol a la membrana del RER *(targeting)*

Los elementos necesarios para dirigir una cadena polipeptídica (unida a un ribosoma) a la membrana del RER fueron identificados hacia 1970 con estudios *in vitro,* y son: la partícula de reconocimiento de señal, el receptor de la partícula de reconocimiento de señal (conocida como proteína *docking*), GTP, GTPasa y la secuencia señal en el péptido naciente.

Partícula de reconocimiento de señal (SRP): la SRP de eucariotas es un complejo ribonucleoproteico soluble que comprende seis polipéptidos y un RNA de 300 pb que dirigen ciertas proteínas secretoras y de membrana al RER.

En mamíferos, el transporte de todas las proteínas a través de la membrana del RE requiere la actividad de la SRP.

Por otro lado, en levaduras, algunas proteínas son dirigidas a la vía secretora por mecanismos alternos que no requieren la participación de la SRP y que utilizan chaperonas moleculares para evitar que las proteínas se plieguen de forma incorrecta para su translocación posterior.

Receptor de la partícula de reconocimiento de señal (SRPR): en mamíferos se localiza en la membrana del RE, y es una proteína integral de membrana, compuesta de dos subunidades alfa y beta GTPasas. La subunidad alfa del receptor del SRP necesita estar unida a un GTP para que ocurra la interacción con la SRP.

Secuencia señal (SS): está localizada en el extremo amino terminal de las proteínas nacientes; contiene un núcleo de 8 a 30 aminoácidos hidrofóbicos y se localiza en todas las proteínas que siguen la ruta secretora. La SS está involucrada en el reconocimiento de la proteína por el sistema de transporte unido a membrana, y en eventos de reconocimiento tempranos del proceso de translocación.

El proceso de *targeting* se regula por 3 GTPasas: las subunidades de 54K (SRP54) de la partícula de reconocimiento de señal (SRP) y las dos subunidades del receptor de la partícula de reconocimiento de señal SRPR. La secuencia del proceso es la siguiente:

1. Se inicia cuando la SRP reconoce en el citosol a la secuencia señal (SS) de la cadena polipeptídica naciente a través de SRP54. Mientras está unida a la SS, la SRP también interactúa con el ribosoma, lo cual incrementa la afinidad de SRP54 por GTP.
2. La interacción hace que la SRP se una al ribosoma, el cual efectúa una pausa en la traducción (detención de la elongación de la cadena polipeptídica).

www.elsolucionario.org

3. Esta pausa ocasiona que el ribosoma se una a la membrana del RER antes de que se complete la síntesis de la cadena polipeptídica, evitando que la proteína sea liberada al citosol. El complejo formado por el ribosoma, el péptido naciente con su SS y la SRP (con GTP unido) se ancla a la membrana del RER. Esta unión involucra dos interacciones distintas: una entre la SRP y su receptor de membrana (proteína *docking)* y la otra entre el ribosoma y el complejo heterotrimérico Sec61p del translocón.
4. La subunidad alfa del receptor de la SRP (SRα) necesita estar en su forma unida a GTP para que ocurra la interacción con la SRP. Posteriormente la SRP se libera de la SS y del ribosoma, permitiendo que continúe la traducción.
5. El ciclo de *targeting* finaliza cuando el GTP se hidroliza de SRP54 y de SRα. Una vez liberada al citosol, la SRP puede comenzar un nuevo ciclo de *targeting.*

Cuando la SRP ha dirigido el complejo cadena polipeptídica–ribosoma al sitio de translocación en el evento de *targeting,* los polipéptidos son transportados a través de la membrana a sitios específicos de translocación denominados translocones, los cuales son estructuras complejas que consisten en varias proteínas que forman un canal hidrofílico a través de la membrana por el cual se transporta la cadena polipeptídica naciente.

Antes del proceso de *targeting,* el translocón se encuentra en su configuración inactiva libre de ribosomas y el SRPR se localiza adyacente al translocón.

El poro del translocón tiene un diámetro pequeño y el extremo luminal del poro está sellado por un proceso dependiente de la proteína BiP una ATPasa que se estudiará más adelante. El complejo proteico NAC (complejo asociado a la cadena naciente) interviene en el evento de *targeting* aumentando su eficiencia, evitando la unión de la SRP a ribosomas que no tienen cadenas nacientes con SS expuestas. El complejo NAC inhibe la interacción SRP–independiente del ribosoma con la membrana del RER, y está involucrado en el evento de dirigir o transportar una proteína a la membrana del RER, evitando el transporte indiscriminado de péptidos a la membrana del RER.

Translocación de proteínas al RER

La translocación de proteínas a través de la membrana del RER y la integración de proteínas de membrana en el RER es el primer paso en el transporte de las proteínas que habrán de formar parte de otros organelos, de aquéllas que serán depositadas extracelularmente o de las que formarán parte de la membrana plasmática.

La translocación de proteínas al RER es el proceso mediante el cual un polipéptido naciente se transporta a través de la bicapa lipídica hacia el lumen (en el caso de proteínas secretoras), o se inserta en la membrana (en el caso de proteínas integrales de membrana) en un evento que puede ocurrir cotraduccionalmente o de forma postraduccional.

Actualmente se conocen los componentes involucrados en la translocación de proteínas a través de la membrana del RER en sistemas libres de células, en los cuales se introducen proteínas a microsomas rugosos con el propósito de identificar, purificar y analizar los componentes de la maquinaria molecular involucrada en la translocación proteica (figura 3–15).

Proteínas del lumen del RER

Las proteínas que residen en el lumen del RER se distinguen de las proteínas secretoras por la presencia de la secuencia Lys–Asp–Glu–Leu (KDEL) en el extremo carboxilo terminal. En la mayoría de las especies, la secuencia predominante es KDEL, pero pueden presentarse variantes de esta señal en diferentes especies: KDEL (vertebrados, *Drosophila, Caenorhabditis elegans* y plantas), HDEL (*Saccharomyces cerevisiae, Kluyveromyces lactis* y plantas), DEL (*Kluyveromyces lactis*), ADEL (*Schizosaccharomyces pombe*), SDEL

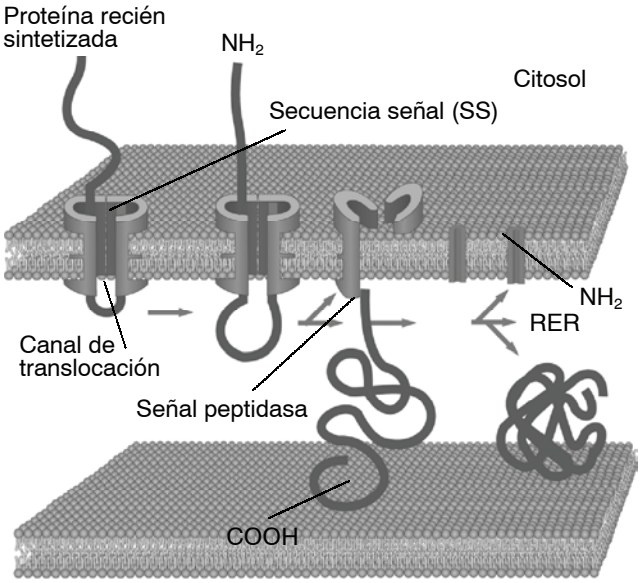


Figura 3–15. Esquema de la translocación de proteínas al RER. En este proceso, el polipéptido naciente se transporta a través de la bicapa lipídica hacia el lumen (en el caso de proteínas secretoras), o se inserta en la membrana (en el caso de proteínas integrales de membrana).

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

(*Plasmodium falciparum*). Las proteínas con la señal KDEL se recuperan de un compartimento pos-RE por un receptor y se regresan a su localización normal. El mecanismo de reciclamiento para la retención de proteínas residentes, como BiP, se conoció en 1990 al fusionarse la señal KDEL al extremo carboxilo-terminal de la enzima lisosomal catepsina D, observándose que ésta se acumuló en el RER y no sufrió las modificaciones que ocurren en el complejo *cis*-Golgi. Esto sugirió la presencia de un receptor que se une a las señales de retención del RE en el complejo de Golgi y que dispara el transporte retrógrado al RE, este receptor (ERD2 *ER-retention defective*) en levaduras y posteriormente en el humano.

Translocación cotraduccional en el RER

En la translocación cotraduccional de mamíferos, el transporte a través de la membrana del RER ocurre mientras la cadena polipeptídica está siendo sintetizada en los ribosomas unidos a la membrana del RER. El modo cotraduccional puede reproducirse experimentalmente con proteoliposomas reconstituidos que contengan el complejo proteico membranoso trimérico (el complejo Sec61p) y el SRPR. Aunque estos tres componentes constituyen el aparato de translocación mínimo en la membrana, se requieren factores adicionales para regular el proceso. En 1996 se observó, mediante proteoliposomas reconstituidos, que la translocación de la mayoría de las proteínas secretoras de mamíferos requieren la participación de la proteína de membrana asociada a la cadena de translocación (TRAM), la cual funciona de manera secuencia señal-dependiente y del complejo Sec6l. Estos dos elementos son los principales componentes del canal de translocación o translocón, el cual está formado por varias proteínas integrales de membrana que se asocian para formar un poro a través del cual pasan, desde el citoplasma hacia el lumen del RE, las proteínas secretoras y los dominios luminales de las proteínas de membrana. Los translocones no constituyen espacios vacíos en la bicapa, sino que son sitios muy dinámicos estructural y funcionalmente. Son como máquinas moleculares que regulan el movimiento de los polipéptidos a través de la bicapa.

Utilizando sondas fluorescentes incorporadas a proteínas secretoras nacientes y experimentos de *quenching* (agentes que apagan la fluorescencia), se demostró que el poro a través del translocón tiene un diámetro de 40 a 60 Å durante la translocación cotraduccional de proteínas. Una vez que la translocación ha terminado, la liberación de los ribosomas causa la contracción del translocón, reduciéndose el diámetro de su poro hasta 15 Å. El mecanismo molecular de translocación cotraduccional y las funciones de los componentes del aparato de translocación todavía no están bien caracterizados, pero experimentos realizados *in vitro* con sistemas reconstituidos han detectado intermediarios de translocación en diferentes periodos de su transferencia a través de la membrana. El transporte cotraduccional de proteínas a través de la membrana del RER se inicia en el citosol, cuando la SS de una cadena polipeptídica creciente emerge del ribosoma que la está traduciendo y es reconocida por la SRP a través de su subunidad de 54 kDa. El complejo formado por el ribosoma, la cadena polipeptídica naciente y la SRP se dirige a la membrana vía dos interacciones: una entre la SRP y el SRPR y la otra entre el ribosoma y el complejo Sec6lp, que es un componente de membrana que forma el canal a través del cual los polipéptidos atraviesan la membrana. Lo que ocurre es una transición de una interacción inicial débil a una interacción fuerte del complejo ribosoma-cadena naciente y el complejo Sec61p que requiere una SS funcional. En el primer paso, el ribosoma se une de manera débil al complejo Sec61p, ya que en los intermediarios de translocación detectados en esta etapa las cadenas nacientes son sensibles a la digestión con proteasas y pueden extraerse con soluciones hipertónicas.

Experimentos de *crosslinking* muestran que, en esta etapa, la SS interactúa con la proteína de translocación de la cadena asociada a la membrana (TRAM). Una vez insertada en el canal, se inicia la translocación de la proteína naciente. Posteriormente, la unión entre el ribosoma y el complejo Sec6lp es más fuerte, ya que la proteína naciente no es sensible a proteasas ni a soluciones hipertónicas.

La transición entre los dos modos de interacción del complejo ribosoma-proteína naciente con la membrana es un paso decisivo durante la translocación. La unión fuerte del complejo ribosoma-Sec6lp, el reconocimiento de la SS en la membrana y la apertura del canal son eventos simultáneos.

Translocación postraduccional

Este proceso es diferente de la translocación cotraduccional con respecto al mecanismo y a los componentes proteicos de membrana involucrados. El transporte postraduccional de proteínas se ha estudiado principalmente en la levadura *S. cerevisiae* para la proteína secretora preprofactor, en el cual la cadena polipeptídica se sintetiza en el citosol antes de ser translocada, y puede reconstituirse con proteoliposomas que contengan el complejo transmembranal de siete proteínas del RER de levaduras llamado complejo Sec, en colaboración con

www.elsolucionario.org

la proteína luminal Kar2p (BiP) y ATP. El complejo Sec consiste en un complejo Sec61p trimérico (Sec61p, Sbh1p y Sss1p), homólogo al de animales, y un complejo tetramérico Sec62/63p (Sec62p, Sec63p, Sec71p y Sec72p). En la vía postraduccional, el *targeting* es independiente de la SRP y de su receptor de membrana. A diferencia de lo que ocurre en la translocación cotraduccional, en el modo postraduccional se desconocen todavía los componentes que reconocen la secuencia señal, aunque recientemente se ha sugerido que Sec62p, Sec71p y Sec72p pueden estar involucrados; la proteína de choque térmico 70 (Hsp70) también interviene en este evento manteniendo la cadena polipeptídica en un estado competente para la translocación.

Experimentos realizados *in vivo* e *in vitro* han dilucidado dos modelos para explicar el mecanismo de transporte proteico postraduccional.

1. En el primer modelo (*the molecular ratchet model*), la ATPasa BiP se une a una porción de la cadena polipeptídica en cuanto ésta emerge del canal Sec61p al lumen del RER, evitando su movimiento retrógrado a través del canal de translocación.
2. En el segundo modelo BiP empuja de manera activa a la proteína a través de la membrana, de manera que BiP actuaría como un motor generador de fuerza uniéndose simultáneamente a la proteína por ser translocada y al dominio J de Sec63p, sufriendo un cambio conformacional que empuja la cadena polipeptídica a través del canal, introduciéndolo.

En los dos casos, BiP interactúa con un dominio luminal de Sec63p de manera ATP-dependiente para proveer la energía necesaria para la translocación.

Integración de proteínas a la membrana del RER

Cuando el complejo ribosoma-proteína naciente se ancla a la membrana del RER, el polipéptido naciente es integrado en la bicapa lipídica. La elección de la vía de procesamiento de la cadena naciente (translocación o integración) está mediada por la presencia de una secuencia transmembranal (TM) en las proteínas de membrana nacientes, que consiste en 20 a 24 aminoácidos no polares que residirán en el interior hidrofóbico de la bicapa. Los polipéptidos nacientes que carecen de la secuencia TM son translocados completamente a través de la membrana del RER, pero los polipéptidos que contengan una secuencia TM serán insertados en la bicapa.

Las proteínas de membrana se integran al RER utilizando el mismo aparato de translocación que transporta proteínas secretoras a través de la membrana. En mecanismo molecular de translocación de proteínas transmembranales la secuencia TM se detecta cuando emerge del ribosoma y entra en contacto con el interior hidrofóbico de la bicapa. La secuencia TM es reconocida por componentes proteicos del translocón, ya que Sec61 y TRAM están en contacto estrecho con la secuencia TM tan pronto como ésta emerge del ribosoma. Una vez reconocida, la secuencia TM se orienta en la dirección adecuada en relación a la bicapa (figura 3-16).

Existen tres modelos que explican la integración de las proteínas de membrana:

1. El ribosoma tiene ciclos de estados unidos a la membrana y estados libres; y las secuencias TM salen del canal de translocación hacia la bicapa antes de que termine la traducción.
2. El ribosoma permanece unido a la membrana durante toda la síntesis de la proteína de membrana, y el péptido es enviado de manera continua al canal de translocación. Las secuencias TM dejan el canal de translocación únicamente después de terminada la traducción.
3. El ribosoma permanece unido a la membrana, el péptido entra de manera continua en el canal de translocación y las secuencias TM salen lateralmente de la bicapa dejando el canal en cualquier momento durante la traducción. Tanto los domi-

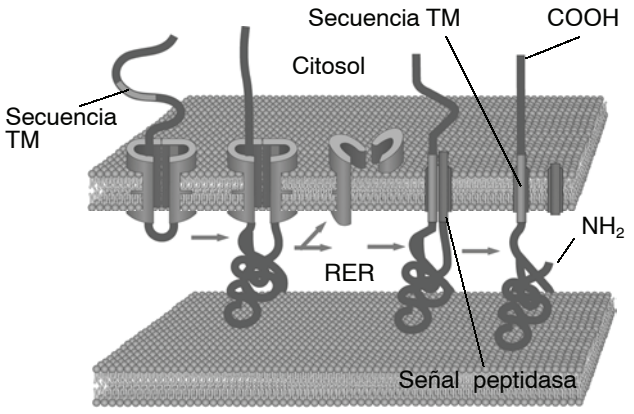


Figura 3-16. Esquema de la integración de proteínas transmembranales a la membrana del RER. Cuando el complejo ribosoma-cadena naciente se une a la membrana del RER, el polipéptido naciente se integra en la bicapa lipídica. La elección de la vía de procesamiento de la cadena naciente, translocación o integración, está mediada por la presencia de una secuencia transmembranal (TM) en las proteínas de membrana nacientes, que consiste en 20 a 24 aminoácidos no polares que residirán en el interior hidrofóbico de la bicapa.

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

nios luminales como los citosólicos de una proteína de membrana se sintetizan mientras el ribosoma está unido a la membrana, de manera que aun los dominios citosólicos están en contacto con el canal de translocación. Antes de que se termine la traducción de una proteína, las secuencias TM pueden salir lateralmente del canal de translocación y entrar en la membrana lipídica.

Modificaciones cotraduccionales y postraduccionales de las proteínas en el RER

Glicosilación de proteínas en el RER (N-glicosilación)

Una de las funciones del RER es la adición covalente de azúcares a las proteínas. La mayoría de las proteínas solubles y de membrana presentes en el RER son glicoproteínas. En el RER, las cadenas de carbohidratos se fijan a una proteína mediante uniones N (al átomo de nitrógeno de un residuo de asparagina Asn), así los oligosacáridos están ligados al extremo amino terminal *(N-linked)* y son los que se encuentran más comúnmente en las glicoproteínas. Las moléculas involucradas en la glicosilación de proteínas son la enzima oligosacariltransferasa, el oligosacárido precursor, la molécula lipídica especial llamada dolicolfosfato y la asparagina blanco en la proteína para transformarse en glicoproteína en el RER (figura 3-17).

Las moléculas involucradas en la desglicosilación y desmanosidación de los oligosacáridos transferidos en el lumen del RER a las proteínas son la UDP-Glc: glicoproteína glicosiltransferasa, la glucosidasa I y II y las manosidasas I y II. La secuencia consenso de glicosilación en la proteína naciente (Asn-X-Ser/Thr, donde X puede ser cualquier aminoácido excepto Pro), es necesaria, pero no suficiente para la glicosilación. El oligosacárido precursor se construye azúcar por azúcar en la molécula lipídica dolicol unida a la membrana antes de su transporte a la proteína. Los carbohidratos son activados primero en el citosol por la formación de intermediarios nucleótido-azúcar, que de forma posterior donan su azúcar al lípido (dolicol). Al inicio de este proceso, el oligosacárido unido al dolicol, que está constituido por cinco residuos de manosa y dos de N-acetilglucosamina ($Man_5GlcNAc_2$), viaja a través de la membrana desde el lado citosólico al lado luminal de la membrana del RER. Los azúcares restantes (cuatro residuos de manosa y tres de glucosa) se añaden en el lado luminal de la membrana. Una vez que el oligosacárido ($Glc_3Man_9GlcNAc_2$) está ensamblado, se transfiere a un residuo de asparagina del polipéptido naciente por la oligosacariltransferasa. El dolicol-pirofosfato (PP) regresa a través de la membrana y está listo para iniciar un nuevo ciclo de aceptación de azúcares. El oligosacárido precursor está unido a la membrana del RER por la molécula dolicol pirofosfato por una unión pirofosfato (PP) de alta energía que provee la energía de activación necesaria para que la glicosilación se lleve a cabo. La adición del oligosacárido ocurre cuando el residuo de asparagina aceptor en el péptido naciente está a una distancia de aproximadamente 12 a 14 residuos de aminoácidos de la membrana.

El oligosacárido es transferido a la asparagina blanco por la enzima oligosacariltransferasa en un solo paso. Esta enzima tiene su sitio activo expuesto al lado luminal de la membrana del RER, lo que explica por qué las proteínas citosólicas no son glicosiladas. En el RER se remueven rápidamente tres residuos de glucosa y uno de manosa de los oligosacáridos de la mayoría de las glicoproteínas por la acción secuencial de la glucosidasa I y II y de las α-manosidasas I y II, respectivamente. El procesamiento de $Glc_3Man_9GlcNAc_2$ se inicia después de la transferencia al polipéptido naciente. La glucosidasa I remueve la glucosa más externa (1-2 ligada), y la glucosidasa II remueve los dos residuos restantes (1-3 ligados). Los glicanos desprovistos de glucosa y con un alto contenido de manosa pueden volver a glicosilarse por la UDP-glucosa glicoproteína glicosiltransferasa si es que las proteínas en las cuales están presentes no se encuentran plegadas por completo. La acción combinada de las enzimas α-manosidasas I y II generan el isómero $Man_7GlcNAc_2$. El ciclo de desglicosilación-reglicosilación continúa hasta que se logra el plegamiento adecuado de las proteínas. Los *N*-oligosacári-

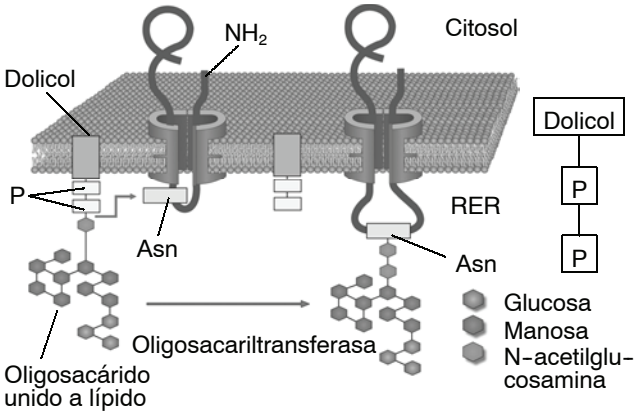


Figura 3-17. Esquema de las modificaciones postraduccionales de las proteínas en el lumen del RER. Se muestra la glicosilación de las proteínas en el lumen del RER (N-glicosilación).

www.elsolucionario.org

dos tienen la función de proveer grupos hidrofílicos que ayudan a mantener las glicoproteínas en solución durante el proceso de plegamiento, y modulan la conformación de las proteínas forzando a los aminoácidos cercanos a la asparagina a estar en proximidad a la interfase agua-glicoproteína. Además, la interacción de los oligosacáridos monoglicosilados con las lectinas del RER potencia el efecto de facilitación de plegamiento del núcleo de alto contenido de manosa y provee un mecanismo para retener las moléculas que todavía no han sido plegadas en el RER.

Plegamiento de proteínas en el RER

Las proteínas que ingresan a la vía secretora adquieren su estructura terciaria y en algunos casos su estructura cuaternaria en el RER.

El lumen del RER difiere significativamente del citosol y de otros sitios subcelulares importantes de plegamiento de proteínas en las células eucariotas porque presenta una concentración mucho más alta de Ca^{++} y un ambiente oxidante que facilita la formación de puentes disulfuro (S-S).

Muchas proteínas residentes del RER tienen la capacidad de unir Ca^{++}, y la función de varias chaperonas (proteínas que intervienen en el plegamiento de otras proteínas) depende de las concentraciones adecuadas de Ca^{++}. En las células de mamíferos y levaduras se han identificado varias proteínas que catalizan la formación de puentes S-S en el RER: la proteína disulfuroisomerasa (PDI o Erp59), Erp72, CaBPI (o P5), Erp57 (o Erp61), etc.

Estas enzimas tienen actividades de tiol: proteína disulfuro oxidorreductasa e isomerasa. En algunos casos también se comportan como chaperonas moleculares y despliegan actividad proteolítica. El RER también tiene chaperonas moleculares clásicas como BiP, GRP78, GRP94 y GRP17O. La expresión de estas proteínas, así como la de la enzima disulfuroisomerasa, se incrementa con la privación de glucosa o en otras condiciones de estrés celular que causan la acumulación de proteínas mal plegadas en el RER *(unfolded protein response)*. BiP es miembro de la familia Hsp7O de ATPasas y es una proteína multifuncional que interactúa de manera pasajera con los péptidos recién sintetizados durante su plegamiento y ensamblaje.

El ATP es necesario para la liberación de los péptidos unidos a BiP. Otras chaperonas moleculares son calnexina (también llamada p88 e IP90) y calreticulina. Ambas proteínas son lectinas que reconocen glicoproteínas en el lumen del RER. El sistema calnexina/calreticulina/glicosiltransferasa interactúa específicamente con las glicoproteínas nacientes, incrementando la eficiencia de plegamiento. El reconocimiento de las glicoproteínas está mediado por los oligosacáridos monoglicosilados unidos a las proteínas.

Estos oligosacáridos contienen glucosa (Glc), manosa (Man) y N-acetilglucosamina (GlcNAc) en la forma general $Glc_1Man_{7\sim9}GlcNAc_2$. La posterior desglicosilación de los oligosacáridos por la glucosidasa II libera a las glicoproteínas de su interacción con calnexina/calreticulina.

Los glicanos monoglicosilados son reglicosilados después por la UDP-Glc glucoproteinglicosiltransferasa (GT), reconocidos otra vez por las lectinas sólo cuando se unen a residuos proteicos plegados de manera incorrecta, ya que GT se comporta como un sensor de conformaciones de glicoproteínas. El ciclo de desglicosilación-reglicosilación continúa hasta que se logre el plegamiento adecuado.

La interacción lectina-oligosacárido monoglicosilado es una de las vías alternativas por medio de las cuales la célula retiene las glicoproteínas plegadas incorrectamente en el RER.

Aunque este mecanismo disminuye la tasa de plegamiento, incrementa su eficiencia, previene la oligomerización prematura de glicoproteínas y su degradación y evita la formación de puentes S-S no nativos impidiendo la agregación, y permite la interacción de residuos de glicoproteínas con las chaperonas.

Control de calidad en el RER

Sólo las proteínas que se pliegan y ensamblan correctamente pueden ingresar en las vesículas de transporte que se dirigen del RER al aparato de Golgi. Inicialmente se creía que la degradación de proteínas no funcionales ocurría en el RER, pero recientemente se ha reconocido que estas proteínas son exportadas del RER y degradadas en el citosol en un proceso conocido como degradación asociada al RER *(ER-associated degradation* o ERAD). Las proteínas mal plegadas son degradadas por el proteasoma en el citosol. El translocón interviene en el transporte retrógrado de proteínas desde el lumen del RE hacia el citoplasma. Todavía no se conoce la regulación del tráfico bidireccional de proteínas a través del canal Sec61. En el transporte retrógrado, el canal parece ser un conducto pasivo y la direccionalidad del transporte parece estar determinada por proteínas accesorias. Numerosas proteínas del lumen del RER y proteínas de membrana están involucradas en el proceso de retrotranslocación, como las proteínas Kar2/BiP y calnexina, Sec63p, la proteína disulfuroisomerasa, Der1p, Hrd3p y Der3p/Hrd1p. Estas proteínas interactúan directamente con el translocón para influir en el movimiento del péptido.

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

Exportación de proteínas del RER

Una vez plegadas y ensambladas de forma correcta, las proteínas de secreción son incorporadas en vesículas de transporte y se exportan al aparato de Golgi.

Existen proteínas accesorias (receptores de transporte) en el RER que interactúan con proteínas secretoras específicas en el compartimento donador y las guían dentro de vesículas de transporte adecuadas. Estos receptores interactúan directa o indirectamente con las proteínas de cubierta que forman las vesículas de transporte, sirviendo como adaptadores que unen la maquinaria de formación de vesículas con el reclutamiento de cargos (proteínas procesadas). En el compartimiento trans-Golgi y en la membrana plasmática se localizan estas moléculas adaptadoras que facilitan la concentración del "cargo" en vesículas con cubiertas de clatrina. Existen receptores de transporte y de señales de clasificación *(sorting)* positivas que dirigen las proteínas secretoras a vesículas de transporte derivadas del RER destinadas al aparato de Golgi.

Dado que las proteínas "cargo" incluyen proteínas solubles y las que atraviesan la membrana una o varias veces, el proceso de empaquetamiento involucra diferentes mecanismos. En la levadura *Saccharomyces cerevisiae,* Shr3p reconoce a los aminoácidos recién sintetizados de las permeasas y los entrega a las vesículas de cubierta II (COPII) naciente; sin embargo, Shr3p permanece en el RER y Erv14p acompaña a las moléculas recién sintetizadas de la proteína de membrana AX12P a las vesículas COPII y viaja junto a ellas al aparato de Golgi. El transporte RER-Golgi involucra a la proteína de cubierta II (COPII).

Las vesículas de COPII llevan a las proteínas recién sintetizadas del RER a Golgi y median el transporte selectivo de "cargos", aunque algunas proteínas salen del RER de manera no selectiva. La mayoría de las proteínas que son empaquetadas en vesículas COPII interactúan específicamente con subunidades de cubierta y receptores cargo. La cubierta de COPII está constituida por los complejos proteicos Sec13p/Sec31p, Sec23p/Sec24p y de la GTPasa Sar1p. Estos componentes son suficientes para generar la formación de vesículas del RER *in vitro* capaces de dirigirse y fusionarse con el aparato de Golgi.

Existen dos modelos para la incorporación del cargo en vesículas de COPII derivadas del RER y para explicar la exportación de proteínas solubles del RER: el modelo de transporte activo y el modelo de flujo en grandes cantidades *(bulk-flow)*.

El modelo de transporte activo incluye un receptor que se une a las proteínas "cargo" para activar la formación de una vesícula de cubierta. En este modelo, las proteínas residentes del RER no se unen al receptor, pero pueden quedar atrapadas en el lumen de la vesícula. Los eventos del lado citosólico de la membrana del RER que llevan al reclutamiento y a la formación de vesículas anterógradas inician con la proteína Sec12p que interactúa con SAR1p, una proteína de unión a GTP que regula el reclutamiento de las cubiertas a la membrana. Sec12p es una proteína tipo II que atraviesa la membrana con un extremo carboxilo terminal luminal glicosilado y que no se encuentra en las vesículas de transporte anterógrado.

El modelo de flujo en grandes cantidades implica la formación espontánea de vesículas, activada por una proteína que atraviesa la membrana y que interactúa con la cubierta. En este modelo, tanto las proteínas residentes como las de secreción y vacuolares son dirigidas a las vesículas por difusión. Este modelo está apoyado por el hecho de que proteínas citosólicas son secretadas cuando son translocadas al RER vía su fusión con péptidos señal. El proceso de empaquetamiento involucra tres familias de proteínas como receptores de transporte:

1. **BAP31:** es una proteína transmembranal que se une de forma específica a una forma recién sintetizada de la proteína de membrana endosomal celubrevina; esta proteína se localiza en el RER y en el compartimento intermedio RER-Golgi (ERGIC). La eliminación del extremo carboxilo-terminal citoplasmático de BAP31 no afecta su interacción con celubrevina, pero causa una acumulación de BAP31 y celubrevina en el RER. De esta forma, BAP31 actúa como un receptor de transporte para celubrevina y su cola citoplasmática contiene una señal de exportación.
2. **ERGIC53:** es un tipo de proteína TM tipo 1, un componente abundante de las vesículas derivadas del RER y de ERGIC. ERGIC53 posee un dominio luminal tipo lectina y una cola citoplasmática corta; esta cola citosólica contiene sitios de unión tanto para COPII (la cubierta del RER al aparato de Golgi) como para COPI (la cubierta del aparato de Golgi al RER); la proteína viaja entre el RER y el aparato de Golgi. El ERGIC53 actúa como un adaptador entre un cargo glicosilado y los componentes de la cubierta.
3. **Proteínas p24:** son una familia de proteínas transmembranales del tipo 1 que son componentes abundantes de las vesículas COPI y COPII. Tienen un dominio luminal grande y un dominio citoplasmático corto que contienen señales de transporte anterógrado y retrógrado.

www.elsolucionario.org

Las vesículas geman del RER y entregan su contenido al aparato de Golgi, donde las proteínas secretoras son modificadas en una ruta dependiente de sus destinos finales, lo cual requiere que las membranas de las vesículas derivadas del RER y del aparato de Golgi se reconozcan unas a otras *(targeting)* y se fusionen de manera que el contenido de las vesículas sea liberado al aparato de Golgi.

Las proteínas de cubierta que dirigen la gemación de vesículas del RER al aparato de Golgi se denominan COPII (figura 3-27).

El *targeting* y la fusión de estas vesículas con la membrana al aparato de Golgi dependen de un grupo separado de proteínas llamadas colectivamente SNARES, que son proteínas integrales de membrana que se proyectan en el citoplasma.

La familia SNARE contiene un gran número de proteínas que regulan gran variedad de eventos de tráfico diferentes en la célula.

El ensamblaje de varias proteínas SNAREs en un complejo que forma un puente entre la vesícula (V-SNARE) y su membrana blanco (T-SNARE) es un evento clave en la fusión. Este complejo SNARE está compuesto de un cúmulo de cuatro hélices alfa construidas por más de cuatro SNAREs diferentes, con todos los dominios TM de las SNAREs agrupados en un extremo del complejo.

El ensamblaje del complejo SNARE resulta directamente en la fusión de las membranas y exocitosis (figura 3-13).

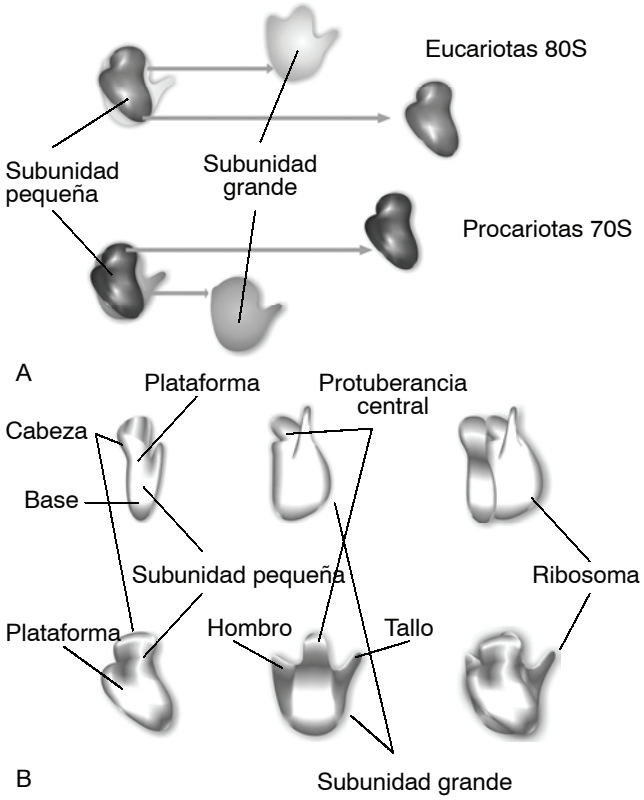


Figura 3-18. ***A.*** Esquema de las dos subunidades que conforman un ribosoma en procariotas y eucariotas (obsérvese su similitud). ***B.*** La subunidad pequeña (30 o 40S) tiene tres regiones, conocidas como cabeza, base y plataforma. La subunidad grande (50S o 60S) incluye la protuberancia central y, a los lados, el hombro y el tallo, respectivamente.

RIBOSOMAS

Son organelos que intervienen en la síntesis proteica y no están recubiertos por membranas. Se encuentran en eucariotas (80S) y procariotas (70S). Contienen RNA ribosomal (rRNA) y cerca de 50 proteínas estructurales. Se componen de una subunidad grande o mayor y otra pequeña o menor, cuya función es llevar a cabo la traducción del mRNA y convertirlo en polipéptido.

Los ribosomas de eubacterias 70S contienen una subunidad menor de 30S con rRNA 16S y 21 proteínas. Su subunidad mayor es de 50S y contiene rRNA 23S, rRNA 5S y 33 proteínas. Los ribosomas eucariotas de 80S contienen una subunidad menor de 40S, rRNA 18S y 34 proteínas; su subunidad mayor es de 60S y contiene rRNA 28S, rRNA 5S, rRNA 5.8S y 49 proteínas (figura 3-18).

Ribosomas de eucariotas

El ribosoma de eucariotas (80S) tiene una masa molecular 4.2 x 10^6 kDa y está formado también por dos subunidades de diferente tamaño que se conocen como de 40S y 60S. La subunidad pequeña de 40S contiene 33 proteínas y una sola molécula de RNA, que es conocida como 18S de 1 900 Pb. La subunidad ribosomal grande 60S contiene 49 moléculas diferentes de proteínas básicas que, al igual que las de la subunidad pequeña, pueden variar en número, dependiendo de la especie biológica en estudio, además de dos proteínas ácidas. Las proteínas ácidas se denominan P1 y P2, debido a que sólo en ribosomas eucarióticos están fosforiladas. La proteína L10 es una fosfoproteína y comparte una zona de homología con las proteínas P1 y P2, por lo que se denomina P0. Las demás proteínas son designadas por las letras S o L, según la subunidad de que se trate, y un número consecutivo. En esta nomenclatura se antepone a la letra correspondiente a estas proteínas una letra "e"

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

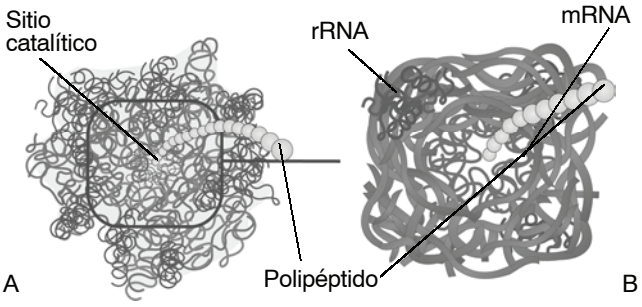


Figura 3-19. ***A.*** Dibujo esquemático donde se muestra el sitio catalítico de las dos subunidades del ribosoma en una estructura de cintas y listones. En rojo se observa el mRNA, y en bolitas amarillas se muestra el polipéptido en formación. En azul se muestra el rRNA. ***B.*** Amplificación del sitio catalítico.

minúscula para diferenciarlas de las proteínas de los ribosomas de procariotas. En cuanto al contenido de RNA, en la subunidad grande existen tres moléculas diferentes: una de 28S de 4 700 Pb, otra de 5S y otra más de 5.8S, que tiene una longitud de alrededor de 160. Las proteínas ribosomales provienen de moléculas ancestrales comunes que en su mayoría han sido conservadas a lo largo de la evolución, de tal modo que se presenta una gran homología entre las especies de eucariotas. La obtención de cristales tridimensionales de los ribosomas 70S, aunada a microscopia de densidad electrónica, ha permitido integrar la estructura global del ribosoma, describir la topografía de su superficie y localizar la posición de las moléculas de proteínas y RNA que lo constituyen. La subunidad 30S es una unidad asimétrica, con una cabeza y una base separadas por una zona como cuello. En la parte más ancha se observa una hendidura profunda denominada plataforma, que es una de las regiones mejor mapeadas y definidas del ribosoma. En la partícula mayor se encuentran las proteínas L7/L12 en el tallo basal y la protuberancia central de la subunidad grande (CP); también existe un asa de RNA (SRL) que proviene del RNA 23S y que marca la zona del centro activo del ribosoma, donde se realiza la función de peptidiltransferasa (PT) (figura 3-19).

Sitios de unión del tRNA

Fueron los primeros sitios identificados en el ribosoma; son dos sitios principales: los sitios A y P, en el centro de la peptidiltransferasa (figura 3-20). El sitio P corresponde a la posición del tRNA de iniciación (tRNAi), unido a la metionina correspondiente durante el inicio de la síntesis de proteínas y posteriormente, durante la elongación, al tRNA acilado al péptido naciente. El sitio A corresponde al tRNA que lleva el nuevo aminoácido que va a pegarse a la cadena peptídica en crecimiento. Las moléculas de tRNA y mRNA forman una zona interconectada como una unidad topológica, cerca de donde se encuentra el centro activo del ribosoma, al inicio del túnel que atraviesa la subunidad 50S desde el sitio donde se lleva a cabo la catálisis del enlace peptídico (PT) hasta el extremo posterior, donde está la salida del péptido en crecimiento; un tercer tRNA con el ribosoma (E) está implicado en la liberación del tRNA desacilado proveniente del sitio P, después de la translocación del ribosoma.

El sitio E está ocupado por el tRNA que acaba de donar el péptido naciente al tRNA que lleva el nuevo aminoácido para decodificar el siguiente triplete en el mRNA. Existe un efecto alostérico entre los sitios E y A del ribosoma, de tal manera que se genera un efecto de cooperatividad negativa entre ambos, lo cual no permite la ocupación simultánea de estos dos sitios. De esta manera, el sitio E estaría ocupado solamente en el estado intermediario, transitorio, durante el movimiento de translocación del ribosoma, en el proceso de elongación. Existen dos estados del ribosoma.

1. Pretranslocación. El tRNA desacilado está en el sitio P y el peptidil-tRNA en el sitio A.
2. Postranslocación. El peptidil-tRNA ocupa el sitio P y el sitio A está vacío y disponible para recibir un nuevo aminoacil-tRNA. En este modelo, los tRNAs quedan en el sitio y con la orientación adecuada para hacer contacto con el mRNA durante el proceso de traducción, de tal forma que cuando el extremo 3' de los tRNAs está localizado en los sitios A y E, en el centro de transferencia peptídica (PT), los dos anticodones respectivos están sobrepuestos a los dos tripletes correspondientes de la cadena del mRNA.

Complejo proteico pentamérico

En la subunidad grande del ribosoma se localiza el tallo lateral, el cual es flexible y está formado por un complejo proteico pentamérico.

En procariotas, este complejo está formado por dos de cada una de las proteínas ribosomales ácidas L7 y L12 y una de L10, que se unen al 23S rRNA entre las bases 1 000 y 1 200 de esta molécula. En eucariotas, el pentámero lo constituyen las proteínas ribosomales ácidas, de tipo P1 y P2 de 12 a 16 kDa. Unida a ellas se encuentra la proteína equivalente a L10, llamada proteí-

www.elsolucionario.org

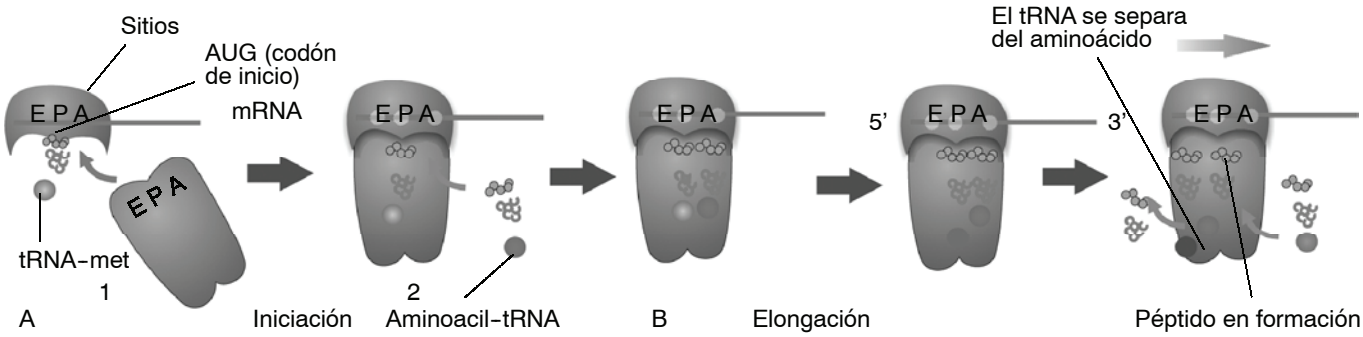


Figura 3-20. ***A.*** Formación del complejo de iniciación en tres pasos. Se muestran los sitios A (aminoacil), P (peptidil) y E o de salidas *(exit).* En el paso 1, los factores de inicio IF-1 y 3 se unen a la subunidad 40S. IF-3 previene la unión prematura de las dos subunidades del ribosoma. En el paso 2 se une el mRNA a la subunidad 40S. La secuencia AUG es guiada correctamente al sitio P. El primer tRNA-metionina es guiado por el factor IF-2. Finalmente se une la subunidad 60S. ***B.*** Elongación. En este proceso participan los factores de elongación EF-Tu y EF-Ts. El factor EF-Tu lleva a los tRNA cargados al sitio A, donde por complementación de codón-anticodón se va traduciendo el mensaje, y de esta manera se van incorporando los nuevos aminoácidos a la proteína naciente.

na P0, y todo el complejo se encuentra ubicado sobre la molécula del 28S rRNA. Esta región del ribosoma incluye la zona del dominio de la GTPasa, donde se lleva a cabo la formación del enlace peptídico con la consecuente elongación del péptido naciente. A este mismo sitio se unen también los factores de elongación de la traducción, interaccionando con las proteínas ácidas del ribosoma.

Biogénesis de los ribosomas

Transcripción del rRNA

Los genomas procarióticos o eucarióticos contienen múltiples copias de genes de rRNA. La combinación de un gran número de copias y promotores fuertes para los genes de rRNA es lo que les permite a las células mantener niveles elevados de ribosomas. En los eucariotas, estos genes están en el nucleolo formando racimos, y es ahí en donde se efectúa el procesamiento del rRNA y el ensamblaje de las proteínas ribosomales. La formación de los rRNAs maduros se produce por procesamiento de los transcritos primarios de elevado peso molecular. Este proceso ocurre con la participación de múltiples enzimas. Los genes que codifican para los rRNAs son colinealmente transcritos, dando lugar a moléculas de pre-rRNAs, las cuales son procesadas posteriormente para dar origen a las distintas moléculas maduras de rRNA. En eubacterias, este transcrito primario se conoce como RNA de 30S (5.5 kilobases) y contiene en forma ordenada secuencial las unidades de 16S, 23S y 5S, con zonas intermedias espaciadoras (figura 3-21A). En cada transcrito primario hay uno o dos tRNAs. El RNA precursor se procesa por efecto de una ribonucleasa (RNasa III) en sitios específicos marcados por metilaciones, produciendo productos pre-rRNAs primarios, los cuales finalmente dan lugar a los rRNAs maduros. Estas reacciones terminales se llevan a cabo por medio de enzimas denominadas madurasas, las cuales usan como sustratos a complejos formados de pre-rRNA y proteínas ribonucleoproteínas (RNP), en los que participan proteínas ribosomales llamadas de ensamblaje temprano. En el caso de los ribosomas de eucariotas ocurre un proceso similar. A partir de una molécula de 45S (13 kb) que contiene las secuencias de 18S, 5.8S y 28S, se forman precursores intermediarios que darán origen a las correspondientes moléculas maduras (figura 3-21B). Al contrario de lo que ocurre en eubacterias, en este caso los genes codificadores de la molécula de 5S rRNA se encuentran separados del resto de los genes de rRNA, y son transcritos por la RNA polimerasa III diferente de la que transcribe a los dos rRNAs mayores y al 5.8S rRNA, ya que ésta es la RNA polimerasa I.

Traducción de las proteínas ribosomales

Ni la localización ni la cotranscripción acoplada de los genes de rRNA son indispensables para mantener la vida de las células. Existe una regulación acoplada entre la expresión de los genes de rRNA y los que codifican para las proteínas estructurales de los ribosomas, y entre sí mismos, para lograr una eficiente producción de ribosomas. A diferencia de los genes para los rRNAs, los que codifican para las proteínas ribosomales se encuentran en una o muy pocas copias en el genoma. Por lo tanto, los mecanismos que regulan su expresión son tam-

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

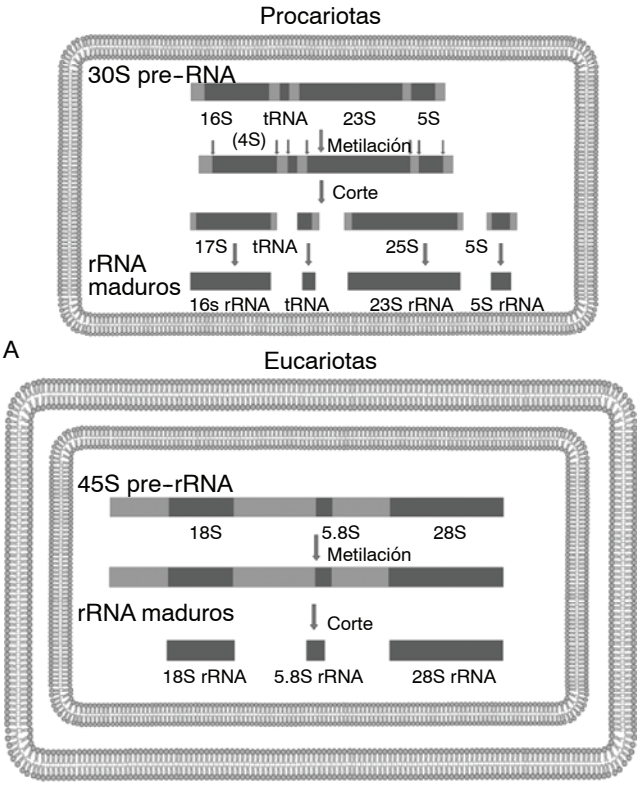


Figura 3-21. Procesamiento de los transcritos primarios de los rRNAs. ***A.*** El transcrito del RNA de eubacterias es una cadena de RNA de 5S, 16S y 23S, y uno o dos tRNAs. Por medio de metilaciones se señalan los sitios que van a ser cortados para producir intermediarios, los cuales finalmente se convierten en tres moléculas maduras de rRNA y tRNA. ***B.*** RNA precursor de rRNAs de eucariotas; el rRNA precursor contiene los rRNAs 5.8S, 18S y 28S, y se procesa por señalizaciones semejantes a las que ocurren en eubacterias. El rRNA 5S se transcribe por otro proceso distinto al de los tres rRNAs previos.

bién diferentes. La coordinación de la síntesis de las moléculas de proteínas ribosomales entre sí se logra a través de regulación transcripcional y postranscripcional. En procariotas, uno de los mecanismos más conocidos es el de la retroinhibición ejercida por algunas de las proteínas ribosomales, que al estar en exceso se unen a su propio mRNA o al de otra proteína ribosomal e impiden su traducción, de tal manera que regulan así su propia concentración. En eucariotas el mecanismo es diferente, aunque la síntesis de las proteínas ribosomales también se regula a nivel traduccional. Los mRNAs que codifican para las proteínas ribosomales (pre-mRNA) de eucariotas contienen una secuencia de nucleótidos, rica en pirimidinas, en la zona 5' no traducible (zona 5'UTR). Alteraciones en esta secuencia bloquean la coordinación en la síntesis de las proteínas ribosomales. La fosforilación de la proteína ribosomal S6 es parte del mecanismo de reconocimiento de esta señal en la zona 5' UTR de los pre-mRNAs (figura 3-21).

Funcionamiento de los ribosomas

La función principal de los ribosomas en las células de todos los organismos es la síntesis de proteínas (traducción). El proceso consta de una serie de reacciones perfectamente coordinadas, que en su conjunto constituyen el llamado proceso de decodificación de mRNAs y que da por resultado la síntesis de nuevas proteínas. Las múltiples y complejas reacciones que se llevan a cabo en el ribosoma son el resultado de la interacción en forma concertada de las moléculas de RNA y de las proteínas que constituyen en su conjunto el aparato traductor en células y organelos como mitocondrias y cloroplastos.

Traducción o síntesis de proteínas

En procariotas la traducción se lleva a cabo en el complejo DNA-RNA simultáneamente al proceso de transcripción, mientras que, en eucariotas, la estructura nuclear separa temporal y físicamente estas dos funciones y, por lo tanto, el mRNA debe viajar al citoplasma para dirigir su traducción. El mRNA determina el tipo de proteína; finalizada la síntesis, las dos subunidades ribosomales se separan. Cada ribosoma sintetiza una copia de la misma cadena polipeptídica. A las proteínas seleccionadas para ser degradadas se les une la ubicuitina (del latín *ubiquitarius,* ubicuo), que las dirige a los proteasomas, aunque también pueden ser degradadas por microautofagia en los lisosomas. El proceso de síntesis de proteínas tiene tres etapas:

Iniciación

Incluye las reacciones que conducen a la formación del complejo de iniciación, consistente en la subunidad ribosómica 30S o 40S, la matriz de mRNA que va a ser traducida, el tRNA iniciador cargado con metionina y varias proteínas accesorias que se llaman factores de iniciación (IF_1, IF_2 e IF_3). En esta etapa de formación del complejo de iniciación es donde existen más diferencias entre el proceso en eubacterias y eucariotas, siendo más complejo este último. Además, es aquí donde confluyen varios mecanismos de control de la traducción que tienen por objeto asegurar que se seleccione el codón de iniciación AUG en el DNA y AUG en el RNA y el marco de lectura para la formación de la proteína correspon-

www.elsolucionario.org

diente. Cuando el complejo de iniciación está ya formado con la subunidad pequeña del ribosoma, se une a este complejo la subunidad grande, y con ello queda lista la maquinaria para continuar el proceso.

Los pasos de la iniciación son:

a. El mRNA se fija por el extremo 5' a la subunidad menor.
b. Por metilación se forma el casquete 5', que fija el mRNA al ribosoma.
c. El codón de inicio (AUG, Met) se fija en el sitio P (peptidilo).
d. La secuencia señal 5' N-terminal de 20 aminoácidos (aa) sólo se sintetiza para las proteínas secretoras y luminales. Las proteínas con secuencia señal son preproteínas.
e. La secuencia de detención de transferencia (20 aa hidrófobos) retiene a las proteínas luminales.

Elongación o prolongación

En esta etapa se alarga la cadena polipeptídica unidireccional. Los ribosomas y los componentes asociados a ellos, como los factores de elongación (EF), se mueven sobre el mRNA en la dirección 5' → 3' y la nueva proteína se sintetiza del extremo amino terminal hacia el carboxilo terminal de la cadena peptídica. Este proceso se efectúa en un microciclo de tres etapas que se repiten a lo largo del mRNA. De esta forma se van traduciendo uno a uno los codones (tripletes de RNA) respectivos que forman el marco de lectura en el mRNA. Para este efecto, las moléculas de aminoacil tRNA van ocupando consecutivamente el sitio A y el sitio P del ribosoma y liberándose en el sitio E a medida que procede la translocación del ribosoma, el deslizamiento del mRNA y la formación del enlace peptídico.

Los pasos de la prolongación son:

a. Los aa se encadenan por enlaces peptídicos.
b. El tRNA contiene 80 nucleótidos y a cada tRNA le corresponde una aminoacil-tRNA-sintetasa que fija el aa correcto.
c. El tRNA unido a un aminoácido se llama aminoacil-tRNA (figuras 3-20 y 3-22).
d. El tRNA con la metionina es el RNA iniciador y se fija al sitio P (peptidilo).
e. El primer aa transportado por su tRNA corresponde al segundo del PP (sitio A o aminoacilo).
f. La peptidiltransferasa cataliza el enlace peptídico entre los aa; es una ribozima de la subunidad mayor del ribosoma.

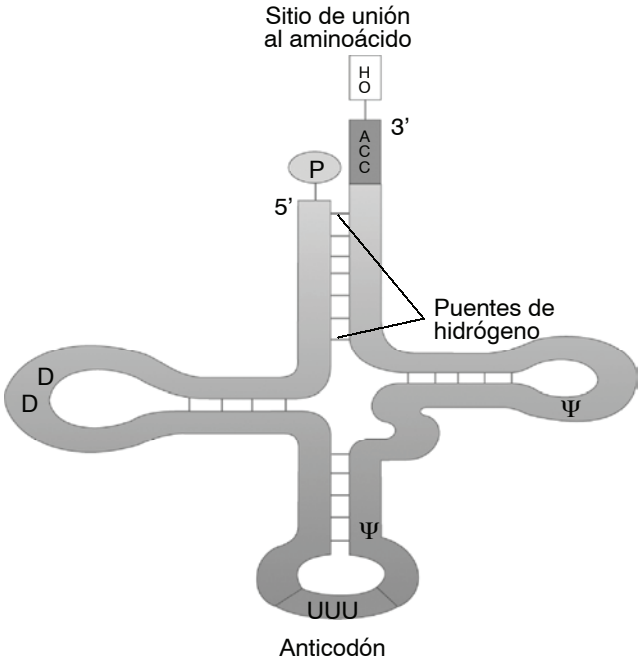


Figura 3-22. Esquema del RNA de transporte (tRNA). Las bases especiales (Ψ) seudouridina y (D) dihidrouridina se derivan del uracilo. Se ilustra el tRNA que transporta lisina.

g. Existen tres factores de elongación EF-Tu, EF-Ts y EF-G.

Terminación

Es el momento en que el complejo de traducción llega a un codón de término (codón sin sentido, UAA, UAG y UGA). En esta posición se separa este complejo ayudado por factores de terminación RF o ERF y se libera la proteína sintetizada. Las dos subunidades del ribosoma se separan y pueden participar en un nuevo ciclo.

Los pasos de la terminación (figura 3-23) son:

a. El proceso se termina en los codones de detención o término UAG, UAA y UGA.
b. En el sitio A se fija un factor de liberación al codón de detención que separa al polipéptido del tRNA.
c. Las dos subunidades ribosomales se separan.
d. El plegamiento es estimulado por las proteínas chaperonas (del francés *chaperon*, dama de compañía), que pertenecen a las proteínas de choque térmico o de estrés.

Formación de polirribosomas

Cuando los ribosomas están sintetizando activamente proteínas, forman estructuras multiméricas denomina-

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

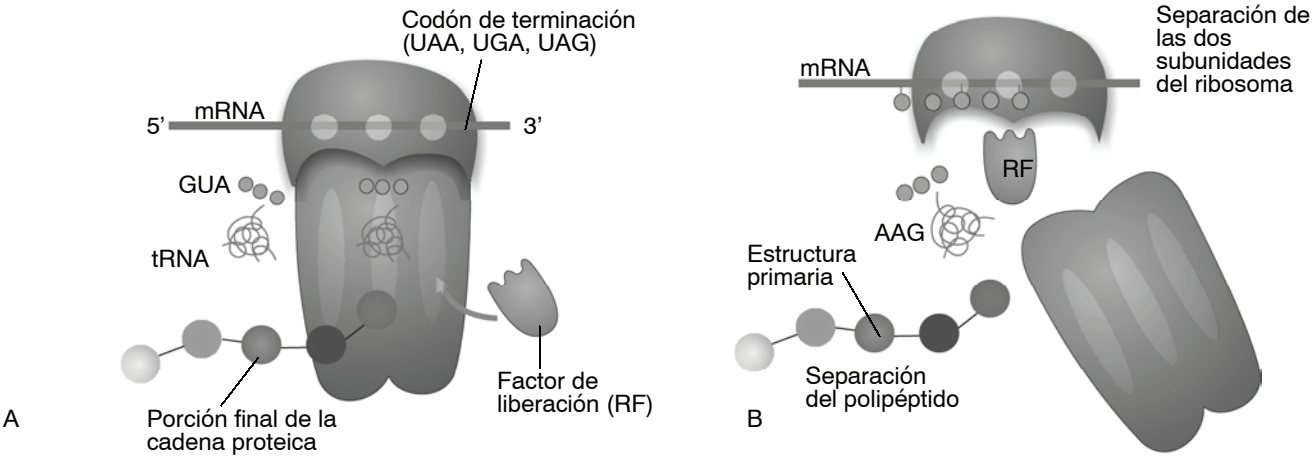


Figura 3-23. ***A.*** Para la terminación de la síntesis de proteínas participan los factores de terminación o de liberación RF 1, 2 y 3 *(release factor),* los cuales, además de detener la síntesis de proteínas, ayudan a la hidrólisis del complejo peptidil-tRNA. ***B.*** Separación de las dos subunidades ribosómicas.

das polisomas (o polirribosomas) (figura 3-24). Los ribosomas se unen entre sí por la molécula de mRNA, en donde se encuentran distribuidos a distancias definidas entre sí. Los polisomas son estructuras comunes en las células y se pueden separar por ultracentrifugación de los ribosomas (monosomas) que no estén participando en el proceso de traducción. De esta manera se pueden aislar los mRNAs que son traducidos en una etapa de la vida celular o de un tejido, pues sólo los mRNAs unidos a los polisomas están siendo traducidos en las células en un momento determinado, lo cual constituye la expresión genética efectiva de una célula y su proteómica particular.

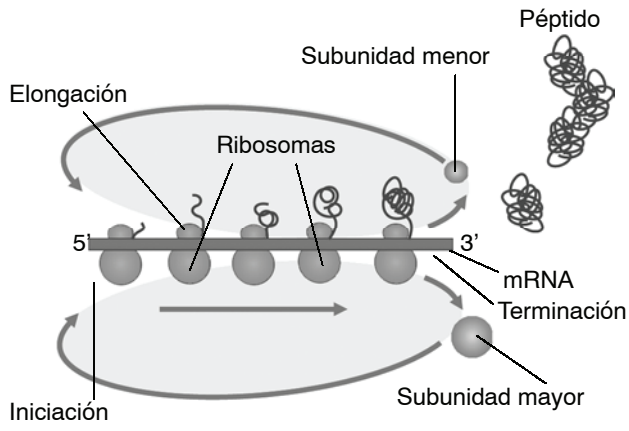


Figura 3-24. Se muestra de forma esquemática la formación de un polisoma. Consta de una molécula de mRNA, en donde se encuentran simultáneamente engarzados varios ribosomas, distribuidos a distancias definidas entre sí.

Ciclo del ribosoma

Las proteínas sintetizadas en el citoplasma celular deben trasladarse a diferentes regiones o estructuras celulares. El destino final de las proteínas está controlado por ciertas señales que permiten dirigir las proteínas a los sitios respectivos donde van a desempeñar su función. En las células eucariotas hay una dinámica de redistribución de los ribosomas en donde unos ribosomas permanecen libres en el citoplasma y otros se movilizan para quedar como ribosomas unidos a la membrana del RER. En estos últimos es en donde se lleva a cabo la síntesis de proteínas que van a ser depositadas en el RER. La señal responsable de la identificación de los ribosomas para su unión con el RER depende del mRNA que se haya integrado al ribosoma. En la etapa temprana de la traducción de estos mensajes queda al descubierto la zona aminoterminal del péptido en formación, la cual contiene una SS cuya longitud puede oscilar entre 13 y 36 aa.

Esta señal, que se antecede de una región de 10 a 15 residuos de aminoácidos hidrofóbicos y algunos aminoácidos con carga positiva, es reconocida por la partícula ribonucleoproteica SRP, constituida por una molécula de RNA (7S) y varias proteínas.

La unión de estas estructuras forma un complejo que a su vez funciona como un adaptador capaz de acoplar la maquinaria de síntesis proteica del citosol a la maquinaria de translocación de proteínas de la membrana del RER, ya que el complejo ribosoma-SRP es anclado en la membrana del RER a través de receptores membranales (figura 3-25).

www.elsolucionario.org

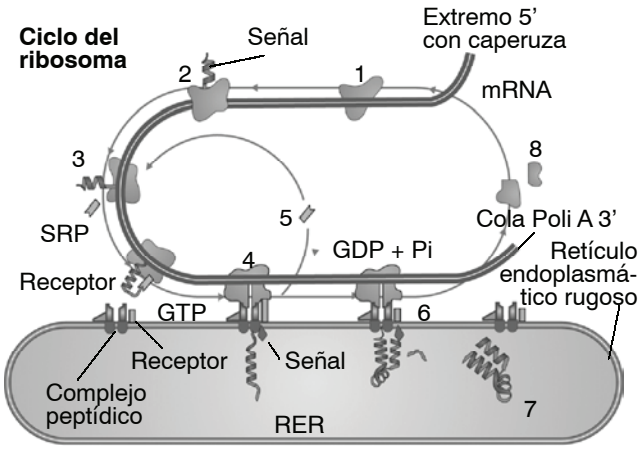


Figura 3-25. Esquema del proceso de síntesis de las proteínas que deben dirigirse al interior del RER (lumen). Los números 1 a 8 describen los pasos importantes del ciclo: 1. Inicio de la síntesis en la posición AUG. 2. Señal en el inicio de la cadena del péptido naciente. 3. Reconocimiento de la señal por la partícula SRP y su unión al ribosoma. 4. Anclaje del ribosoma en el receptor de la membrana del RER. 5. Desprendimiento de la partícula SRP. 6. Continuación de la traducción del mensaje que lleva el ribosoma. 7. Desprendimiento de la proteína ya terminada. 8. Separación de las dos subunidades del ribosoma para iniciar un nuevo ciclo.

La partícula SRP se libera hacia el citosol, mientras que el ribosoma permanece unido a la membrana del RER hasta terminar la síntesis de la proteína correspondiente dirigida al interior del lumen del RER. Este proceso constituye el ciclo del ribosoma (figura 3-25).

Regulación de la traducción

Todas las moléculas que intervienen en la traducción pueden ser reguladores (tRNA, mRNA, etc.). Al existir aminoácidos representados por varios codones, hay algunos tRNA más abundantes que otros, lo que limita la expresión del codón, ya que un tRNA difícil de encontrar se usa menos.

Factores que regulan la traducción del RNA mensajero

En procariotas, si la secuencia de Shine Dalgarno (secuencia AGGAGG previa al codón AUG que fija el mRNA al ribosoma) está bloqueada por una proteína reguladora, no se traduce el RNA mensajero. El mecanismo anterior permite la regulación a nivel de la traducción.

Alteración de los factores proteicos IF y EF por modificación covalente (fosforilación)

En la traducción, el punto de control más importante es la iniciación, porque es la etapa más lenta. Los antibióticos que matan bacterias al bloquear la síntesis de proteínas, como el cloramfenicol, que bloquea la síntesis del enlace peptídico, no tienen efecto en los eucariotas, ya que el mecanismo de síntesis proteica es diferente.

Si se bloquean los factores de iniciación (IF), de elongación (EF) y de terminación (RF), se detiene la traducción.

APARATO DE GOLGI O DICTIOSOMA

El aparato de Golgi (AG), llamado también complejo o cuerpo de Golgi, fue descubierto en 1898 por el investigador italiano Camilo Golgi (neurólogo), quien fue premio Nobel de medicina en 1906. Este organelo se descubrió en neuronas que estaban siendo estudiadas por métodos de tinción argéntica (sales de plata), denominadas de hecho tinción de Golgi, donde se pueden apreciar zonas más o menos diferenciadas en cuanto a su función y a su composición proteica. Este organelo también está recubierto de una membrana similar a la membrana plasmática, la cual consta de una bicapa lipídica con una gran variedad de proteínas transmembranales (figura 3-26).

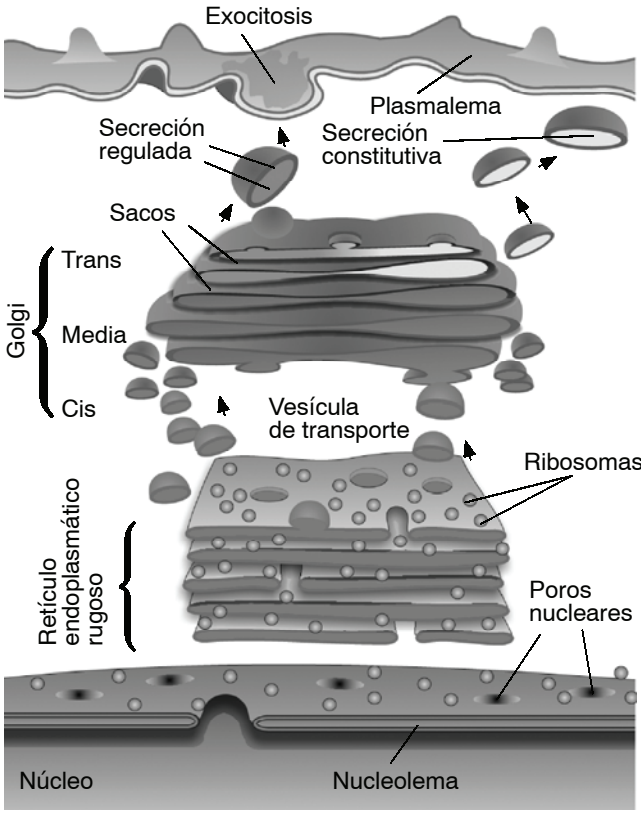
El complejo de Golgi es un apilamiento de sacos aplanados, con bordes dilatados y vesículas densas y grandes vacuolas claras ubicadas cerca de estos bordes. Estos dos últimos componentes pueden ser el resultado de la modificación de los sacos aplanados. Todas estas estructuras están compuestas por membranas. En células vegetales hay numerosas estructuras separadas y dispersas en el citoplasma, que equivalen al AG y que reciben el nombre de dictiosomas. El tamaño, la distribución dentro de la célula y otras características, como el número de sacos apilados de este sistema, varían de acuerdo con el estado metabólico de la célula.

La red discontinua de cisternas o sacos membranosos aplanados del AG se sitúa cerca del núcleo, íntimamente relacionada con el retículo endoplasmático. Su conexión con éste no es física, sino que es mediada por transportadores vesiculares que se desplazan a través del citoplasma asociados a elementos del citoesqueleto.

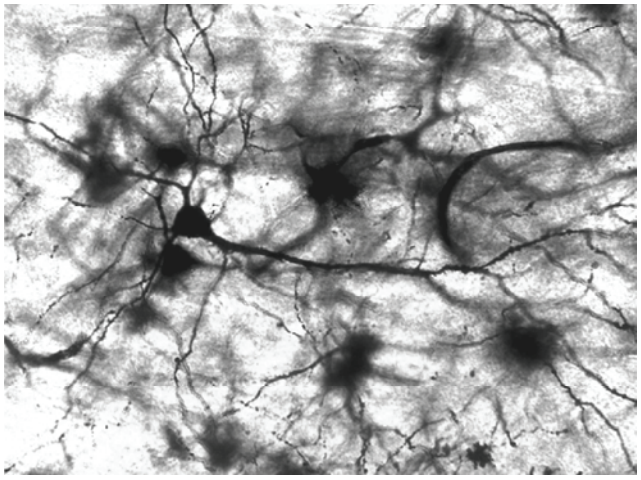
En células de mamífero secretoras se localiza entre el núcleo, muy cerca de los centrosomas, y el ápice, des-

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org



A



B

Figura 3-26. Aparato de Golgi. ***A.*** Es característico que el complejo de Golgi se tiña con tetróxido de osmio y sales de plata (tinción de Golgi). Tiene una localización, un tamaño y un desarrollo característicos en cada estirpe celular y de acuerdo con el estado fisiológico. En la cara *cis* se encuentran las vesículas de transición, mientras que en la cara *trans* se localizan las de secreción. ***B.*** Fotografía de neuronas teñidas con la técnica de Golgi–Cox. 400 X.

de donde se libera el producto de secreción de la célula. En otros tipos celulares sin actividad secretora polarizada puede formar una estructura reticulada alrededor del núcleo, como en las neuronas.

Con microscopia electrónica se observan numerosas cisternas aplanadas, limitadas por membranas, dispuestas como pilas; estas pilas por lo general contienen de 3 a 10 cisternas, cada una de las cuales suele estar un poco dilatada en la periferia y adoptar una forma curva, por lo que la pila en conjunto presenta una superficie convexa orientada hacia el núcleo celular.

El complejo de Golgi está relacionado con procesos de secreción celular. Dirige las proteínas recién sintetizadas hacia los lugares que deben ocupar en la célula. La unidad básica de este organelo es el sáculo (también llamado cisterna), que consiste en una vesícula o cisterna aplanada, la cual mide 1 μm, aproximadamente. Cuando una serie de sáculos se apilan, pueden formar un dictiosoma. Además, puede observarse toda una serie de vesículas más o menos esféricas a ambos lados y entre los sáculos.

El conjunto de todos los dictiosomas y vesículas constituye el AG. El dictiosoma se encuentra en íntima relación con el retículo endoplasmático, lo que permite diferenciar dos caras: la cara *cis,* más próxima al retículo, y la cara *trans,* más alejada. Entre ambas regiones existen cisternas centrales o medias que pueden variar en número. En la cara *cis* se encuentran las vesículas de transición, mientras que en la cara *trans* se localizan las vesículas de secreción. La cara convexa (que generalmente mira hacia el núcleo) es la zona *cis;* hacia la periferia se encuentra la zona medial, y la cara con mayor concavidad es la zona *trans*.

Tanto en la cara *cis* como en la *trans* existe una zona de alta formación y fusión de vesículas, constituyendo una especie de malla o red.

Cara externa, proximal o *cis*: es la más cercana al RER, del que recibe las vesículas de transición, que son sáculos con proteínas que han sido sintetizadas en la membrana del RER, introducidas dentro de sus cavidades y transportadas por el lumen hasta la parte más externa del organelo. Estas vesículas de transición son el vehículo de las proteínas que serán transportadas a la cara externa del AG.

Cara interna, distante o *trans:* es la que se localiza en cercanía con el plasmalema. En el interior de los sáculos del dictiosoma las proteínas pasan por una serie de modificaciones postraduccionales hasta su composición final. Cuando llegan a la zona interna o distante, pasan a una vesícula de secreción, pudiéndose unir a otras formando un gránulo de secreción que se libera por exocitosis al espacio extracelular.

Para el transporte de macromoléculas, el AG participa en dos mecanismos:

www.elsolucionario.org

1. **Endocitosis:** es la adquisición de sustancias mediante su internalización a través de la membrana plasmática.
2. **Exocitosis:** es la expulsión de moléculas mediante fusión de las vesículas que contienen la sustancia por exportar con la membrana celular.

El AG es el organelo procesador, empaquetador, distribuidor, secretor y de transferencia de glicoproteínas y glicolípidos en las células. Recibe las proteínas inmaduras desde el RER, para englobarlas en vesículas que después son liberadas como proteínas maduras hacia diferentes destinos finales. Con estas modificaciones se consigue la estructura definitiva, o se realiza la proteólisis de ciertas proteínas, para obtener la forma activa. Un ejemplo típico es la insulina que se sintetiza en el RER de las células acinosas del páncreas en forma de proinsulina, y en el AG se transforma en la conformación definitiva o activa.

Entre las funciones que posee el AG se encuentran la glicosilación de proteínas, selección *(sorting),* destino *(targeting),* glicosilación de lípidos y síntesis de polisacáridos de la matriz extracelular. El proceso de glicosilación, que la mayoría de las veces se inicia en el RER, le proporciona a la molécula procesada propiedades especiales. Las proteínas glicosiladas forman los componentes básicos del glicocálix (capa de oligosacáridos ubicada en la cara externa del plasmalema), que tiene un papel fundamental en procesos de comunicación celular y transducción de señales.

También proporciona resistencia mecánica adicional a las moléculas, como en el caso de hormonas o mensajeros a distancia. Desde la cisterna *trans* se originan vesículas con productos maduros, ya sea a la membrana plasmática o a otros organelos, como los lisosomas. Las proteínas llegan desde el retículo hasta la cara *cis,* mientras que los productos salen por la cara *trans* y son transportados en vesículas a otras partes de la célula o al exterior conteniendo una mezcla de glúcidos y proteínas (figura 3-27).

Las funciones generales del AG son las siguientes:

1. Conjugación entre proteínas e hidratos de carbono para formar glicoproteínas de secreción.
2. Modifica sustancias sintetizadas en el RER. Estas transformaciones pueden ser agregados de restos de carbohidratos ligadas a O. Glicosilaciones relacionadas con la incorporación de azúcares en los grupos –OH de aminoácidos, como serina y treonina en los polipéptidos.
3. También forma N-glicosilaciones asociadas con la incorporación de azúcares en el aminoácido N-asparagina de los polipéptidos.

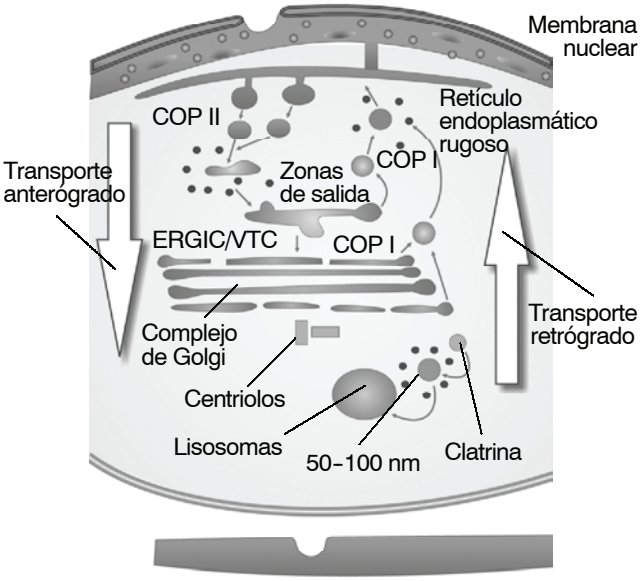


Figura 3-27. Esquema del transporte intracelular entre el retículo endoplasmático rugoso (RER) y el aparato de Golgi (AG). El AG está englobado por el RER y se sitúa alrededor de los centriolos (centrosoma). Entre el RER y el AG se sitúan estructuras tubulovesiculares que forman el compartimento conocido como complejo de transporte vesiculotubular (ERGIC o VTC). De las proteínas de cubierta (COP), COP I recubre al AG y COP II recubre las vesículas que van del RER al AG.

4. Forma las sulfataciones en el residuo de tirosina de las proteínas; todas las proteínas sulfatadas son proteínas de membrana o de secreción.
5. Maduración de las glicoproteínas provenientes del RER.
6. Interviene en los procesos de secreción, almacenamiento, transporte y transferencia de glicoproteínas.
7. Circulación intracelular de moléculas.
8. Síntesis de algunos hidratos de carbono de alto peso molecular: celulosa (en plantas), polisacáridos complejos.
9. Producción de membrana citoplasmática: los gránulos de secreción, cuando se unen a la membrana en la exocitosis, se integran a ésta.
10. Participa en la formación del nucleolema.
11. Formación de la pared celular vegetal.
12. Interviene en la formación de lisosomas.
13. Concentración, condensación y empaquetamiento de la sustancia de secreción dentro de una vesícula limitada por membrana.
14. Formación del fragmoplasto en la división celular vegetal: los dictiosomas se agrupan alrededor de microtúbulos en la zona ecuatorial de la célula y forman el fragmoplasto, que después se transforma en la placa celular que separa las dos células hijas.

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

15. Secreción celular. Las moléculas atraviesan todos los sáculos del AG y, cuando llegan a la cara *trans* del dictiosoma en forma de vesículas de secreción, son transportadas a su destino fuera de la célula, atravesando la membrana citoplasmática por exocitosis.

16. Forma el acrosoma de los espermatozoides. En la maduración de espermátides a espermatozoides algunas vesículas del AG se fusionan para formar una vesícula mayor, que se extiende y forma un casquete alrededor del polo anterior del núcleo. Este casquete se denomina acrosoma y contiene diversas enzimas hidrolíticas que facilitarán la penetración al óvulo, atravesando las células que lo rodean y su zona pelúcida.

17. Formación de microdominios de lípidos de membrana (*rafts*). Son plataformas de glicolípidos y colesterol que intervienen en el tráfico y selección de proteínas, en la endocitosis y en la organización a nivel de membrana de las vías de señalización.

VACUOLAS

Son vesículas de diámetros diversos limitadas por una unidad de membrana. En general, su función es la de almacenamiento y transporte. En las células vegetales es común encontrar una vacuola única que ocupa de 80 a 90% del volumen celular. La membrana que la limita se denomina tonoplasto y es semipermeable. El contenido de la vacuola está integrado por agua y altas concentraciones de sales inorgánicas, azúcares y otras sustancias. El citoplasma y el núcleo quedan comprimidos por esta vacuola contra la membrana plasmática y la pared celular. En esa fina capa periférica se observan los movimientos citoplasmáticos, como la ciclosis. El tonoplasto tiene la función de controlar la turgencia de la célula vegetal, ya que la presión que ejerce sobre su membrana se transmite al citoplasma y mantiene a la membrana plasmática adherida contra la pared celular.

CUERPOS MULTIVESICULARES

En muchos tipos celulares se ven vacuolas rodeadas de membrana que contienen muchas pequeñas vesículas en su interior. Estos cuerpos multivesiculares se tiñen con reacciones histoquímicas para la fosfatasa ácida y se consideran lisosomas modificados. Su origen y su relación con los lisosomas comunes densos es controversial.

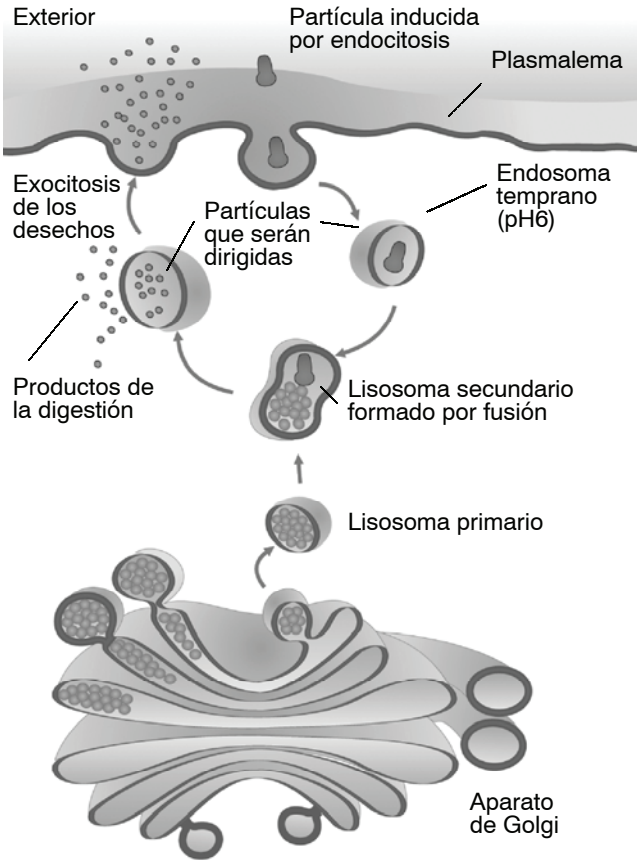


Figura 3-28. Ciclo del lisosoma. Los lisosomas son vesículas esféricas u ovales, limitadas por membrana que se forman a partir del aparato de Golgi, y cuando se convierten en lisosomas secundarios vierten su contenido por exocitosis con utilización de APT y GTP. Contienen enzimas hidrolíticas (partículas líticas) cuyo pH óptimo es ácido (de 4.8 a 5.2).

LISOSOMAS

Son vesículas esféricas u ovales limitadas por membrana que se forman a partir del AG y, cuando se convierten en lisosomas secundarios, vierten su contenido por exocitosis (figura 3-28). Contienen enzimas hidrolíticas (partículas líticas) cuyo pH óptimo es ácido (de 4.8 a 5.2). Se han identificado más de 50 hidrolasas ácidas, entre las que se encuentran fosfatasas, nucleasas, etc. Los lisosomas tienen la capacidad de hidrolizar cualquier tipo de partícula biológica extracelular, capturada

www.elsolucionario.org

por endocitosis por la célula o intracelularmente por autofagia. La degradación de moléculas en sus componentes y la transferencia de éstos en el citoplasma permiten a la célula su reutilización para sintetizar nuevas macromoléculas. Una célula puede contener varios cientos de vacuolas lisosomales, las cuales son variables en su tamaño, forma y contenido. La apariencia del lisosoma refleja la naturaleza del material que contiene y que está en proceso de digestión; en él se puede observar desde material recién ingerido, cuyo origen puede ser fácilmente reconocido, hasta residuos que no pueden ser digeridos.

Esta heterogeneidad contrasta con la estructura uniforme de otros organelos celulares, de forma que su polimorfismo casi ha llegado a convertirse en una distinción para los lisosomas. A diferencia de otros organelos celulares, los lisosomas no pueden identificarse por criterios morfológicos comunes de tamaño, forma o estructura interna, ya que en su interior no se detecta ninguna estructura fina. Los lisosomas se deben identificar con el microscopio electrónico con base en los criterios que los definen, esto es, como vesículas formadas por una membrana simple, cuyo tamaño es variable (de 0.2 a 2 nm) y que presentan una reacción positiva a tinciones citoquímicas específicas para hidrolasas ácidas.

Algunas de las enzimas lisosomales más conocidas son:

1. **Catepsinas y otras proteasas:** participan en la hidrólisis de proteínas.
2. **Nucleasas:** intervienen en la hidrólisis de ácidos nucleicos.
3. **Fosfatasas:** participan en la hidrólisis de fosfatos de moléculas orgánicas.
4. **Lipasas y fosfolipasas:** intervienen en la hidrólisis de lípidos y fosfolípidos.
5. **Glucosidasas:** intervienen en la hidrólisis de polisacáridos simples y complejos.

Las hidrolasas lisosomales sólo actúan en presencia de las sustancias por digerir. La membrana del lisosoma es estable pero, si es dañada, las enzimas que se liberan pueden degradar todos los componentes celulares.

Digestión intercelular

Las sustancias por digerir pueden provenir de la misma célula (autofagia) o ser incorporadas desde el exterior por fagocitosis, pinocitosis, etc. Para las macromoléculas exógenas, el proceso de digestión se realiza por una serie de pasos:

1. Entrada de la sustancia a la célula por fagocitosis, pinocitosis o endocitosis, con lo cual la sustancia queda incluida dentro de una vacuola endocítica.
2. Contacto y fusión entre las membranas de una vacuola fagocítica y un lisosoma primario. Al ponerse en contacto el contenido enzimático lisosomal con la sustancia por digerir, comienza la hidrólisis de ésta. En este momento la vacuola fagocítica y el lisosoma se transforman en lisosoma secundario o vacuola digestiva.
3. Durante la hidrólisis, los productos solubles atraviesan la membrana del lisosoma secundario y son aprovechados en el citoplasma como materia prima.
4. Las sustancias no digeribles pueden acumularse en los lisosomas como cuerpos residuales, o bien formar una vesícula de eliminación que vuelca los productos de desecho en el exterior de la célula por exocitosis (figura 3-28).

PEROXISOMAS

Los peroxisomas son organelos limitados por membrana que contienen enzimas oxidativas como catalasa y peroxidasa. Todas las enzimas oxidativas generan peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Una proteína destinada a los peroxisomas debe tener una señal de orientación peroxisómica unida en su extremo C-terminal. Mediante centrifugación separativa se pueden aislar fracciones lisosomales iniciales que carecen de hidrolasas ácidas, pero que son ricas en uratooxidasa, en D-aminoácido-oxidasa y en catalasa. Se les llama peroxisomas a causa de la capacidad de dos de sus enzimas de producir peróxido de hidrógeno.

Estos cuerpos esféricos limitados por membrana corresponden a los microcuerpos descritos por microscopistas. Parece ser que se originan de evaginaciones del REL, ya que sus membranas limitan. Otra teoría señala que sus enzimas son sintetizadas por los ribosomas y que se liberan en la matriz citoplasmática, donde forman agregados que posteriormente adquieren una membrana.

En los peroxisomas también se realiza la betaoxidación de los ácidos grasos, al igual que las mitocondrias.

PROTEASOMAS

Los proteasomas son grandes complejos con múltiples subunidades. Actúan como unidades que degradan pro-

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

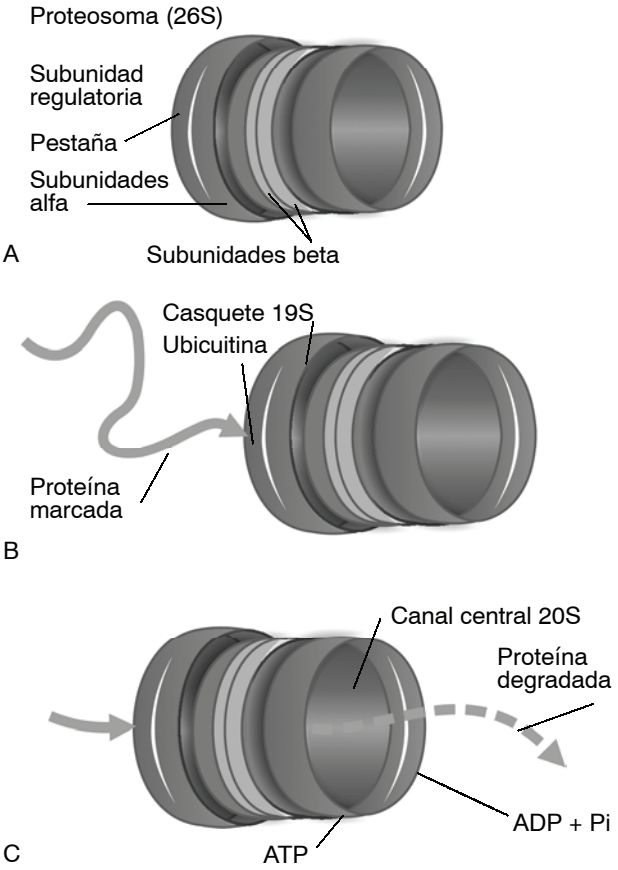


Figura 3-29. Esquema del proteasomas y la degradación de proteínas. ***A.*** Los proteasomas son grandes complejos con múltiples subunidades que contienen a las proteasas en forma de pequeños cilindros sin membrana circundante. ***B.*** Las proteínas citosólicas destinadas a ser degradadas en los proteasomas se marcan con ubicuitina. Éstos tienen la capacidad de reconocer las proteínas marcadas mediante el casquete 19S. ***C.*** Las proteínas que pasan al espacio central del proteasoma se degradan a péptidos pequeños debido a la actividad de proteasa dependiente de ATP.

teínas (las proteasas son enzimas que degradan proteínas) con la forma de pequeños cilindros sin membrana circundante. Cada proteasoma se compone de un cilindro de alrededor de 15 nm de largo con un canal central (el proteasoma 20S) que consiste en proteasas con sus sitios proteolíticos orientados hacia la unidad del cilindro. En cada extremo del cilindro hay un complejo proteico que forma un casquete 19S (el proteasoma 20S más los dos casquetes 19S componen en conjunto un proteasoma 26S), que posee actividad ATPasa y puede reconocer conjugados de proteína y ubicuitina (figura 3-29).

Estos organelos tienen la función de degradar proteínas (también se degradan proteínas en la luz del REL y en el sistema lisosómico-endosómico). Las proteínas citosólicas destinadas a ser degradadas en los proteasomas se marcan con ubicuitina.

Tienen la capacidad de reconocer las proteínas marcadas mediante el casquete 19S. Así se seleccionan las proteínas, que pasan al espacio central del proteasoma, donde se degradan a péptidos pequeños debido a la actividad de proteasa dependiente de ATP. La degradación de proteínas en los proteasomas es un proceso regulado y muy selectivo, que por una parte elimina las proteínas anormales de la célula y por otra contribuye a la regulación de importantes procesos celulares. Esto se observa, por ejemplo, en el control del ciclo celular, dado que los proteasomas degradan ciclinas específicas y regulan los procesos metabólicos a través de la degradación, mediada por señales, de enzimas clave y de proteínas reguladoras.

La degradación de proteínas por los proteasomas también interviene en el procesamiento y presentación de antígenos.

Ubicuitinización

Es un proceso ATP dependiente de marcado de proteínas para su degradación. La ubicuitina es una proteína pequeña de 76 aminoácidos. Por el proceso de ubicuitinización se une a proteínas mayores en residuos de lisina y las marca para su posterior procesamiento por los proteasomas. En este proceso intervienen tres clases de enzimas:

1. E1: activadora de ubicuitina.
2. E2: se asocia con la ubicuitina activada.
3. E3: transfiere la ubicuitina desde E2 a la proteína.

MITOCONDRIAS

Las mitocondrias (del griego *mitos,* hilo, hebra; *chondros,* grano, terrón, cartílago) son organelos granulares y filamentosos que se encuentran como flotando en el citoplasma de todas las células animales. Aunque su distribución dentro de la célula es generalmente uniforme, existen excepciones, ya que pueden desplazarse de una parte a otra de la célula. Su tamaño es variable, pero por lo general presentan un solo tamaño. Es frecuente que la anchura sea de 0.5 μm, y la longitud sea de 5 μm. Las mitocondrias presentan diversas formas, pero por lo general son cilíndricas u ovoides, aunque también las hay esféricas y en forma de "Y" (figuras 3-30 y 3-31). En promedio, hay unas 2 000 mitocondrias por célula,

www.elsolucionario.org

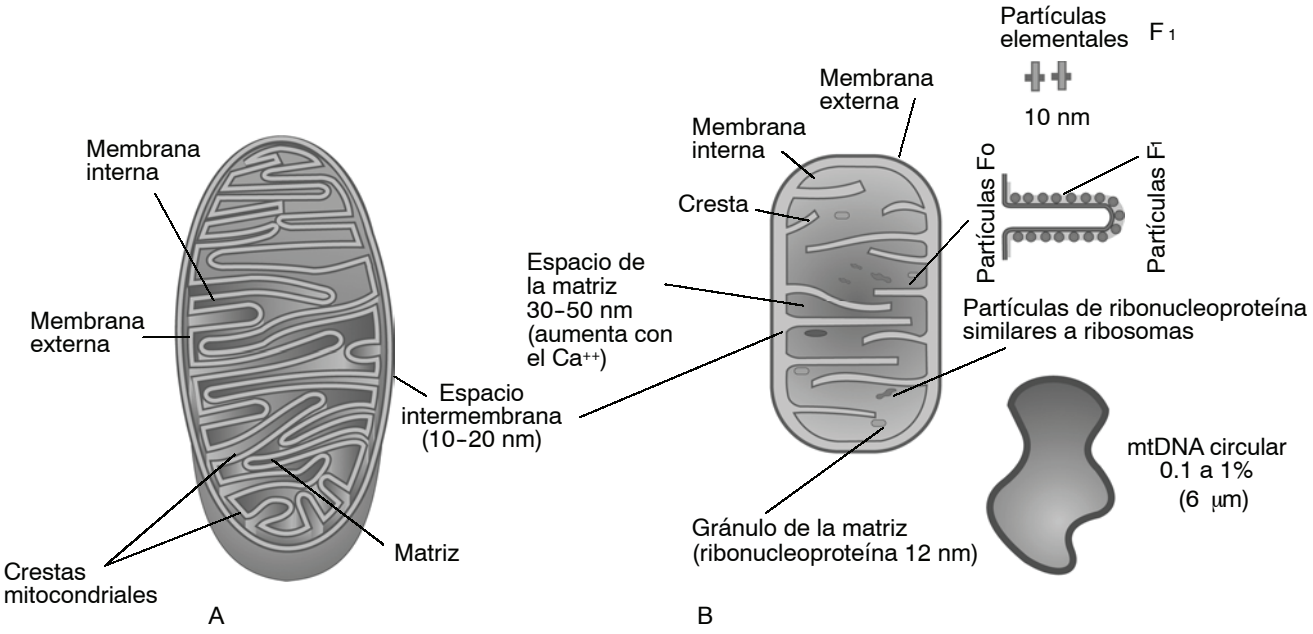


Figura 3–30. Dibujo esquemático donde se muestra la mitocondria humana con algunas de sus estructuras. ***A.*** La mitocondria es un organelo limitado por dos membranas separadas por un espacio intermembrana. La membrana interna con sus crestas contiene la matriz mitocondrial. ***B.*** Las crestas presentan, a su vez, proyecciones en forma de hongo, que se denominan partículas elementales o conjuntos respiratorios. Este organelo tiene varios cientos de copias de DNA circular de 6 μm.

pero las células que desarrollan trabajos intensos, como las musculares, tienen un número mayor que las poco activas, como las epiteliales. Una mitocondria está rodeada por una membrana mitocondrial externa dentro de la cual hay otra estructura membranosa, la membrana mitocondrial interna recubierta de cardiolipina (barrera), que emite pliegues hacia el interior para formar las crestas mitocondriales; éstas, a su vez, se encuentran tapizadas de pequeños salientes denominados partículas elementales. Entre las dos membranas mitocondriales queda un espacio llamado cámara externa o espacio intermembrana, mientras que la cámara interna es un espacio limitado por la membrana mitocondrial interna, que se encuentra llena de un material denominado matriz mitocondrial. En el interior de las mitocondrias, localizadas en distintas porciones, se localizan las enzimas que intervienen en el ciclo de Krebs, así como las que participan en las cadenas de transporte de electrones y de fosforilación oxidativa. Esto ha hecho que se compare a las mitocondrias con hornos en los que los seres vivos queman (oxidan) diferentes componentes para recuperar la energía que contienen y convertirla en ATP. La mayoría de las mitocondrias se originan por duplicación de otras ya existentes, antes de la división celular (fisión binaria).

Los nutrientes se escinden en el citoplasma para formar ácido pirúvico, que penetra en la mitocondria en una serie de reacciones, parte de las cuales involucran al ciclo de Krebs o del ácido cítrico. El ácido pirúvico reacciona con agua para producir dióxido de carbono y 10 átomos de hidrógeno. Estos átomos de hidrógeno se transportan hasta las crestas de la membrana interna a lo largo de una cadena de moléculas especiales llamadas coenzimas. Una vez allí, las coenzimas donan los hidrógenos a una serie de proteínas enlazadas a la membrana, que forman lo que se llama cadena de transporte de electrones.

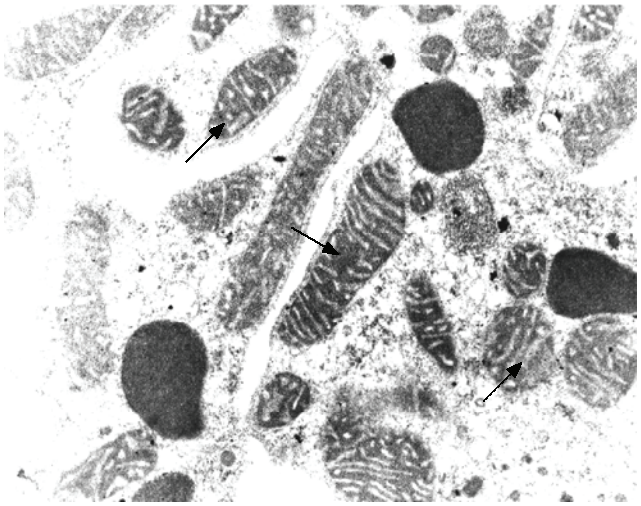
La cadena de transporte de electrones separa los electrones y los protones de cada uno de los 10 átomos de hidrógeno. Los 10 electrones se envían a lo largo de la cadena y acaban por combinarse con oxígeno y protones para formar agua. La energía se libera a medida que los electrones pasan desde las coenzimas hasta los átomos de oxígeno, y se almacena en compuestos de la cadena de transporte de electrones.

Los componentes de la cadena bombean aleatoriamente protones desde la matriz hacia el espacio intermembrana. Los protones sólo pueden volver a la matriz por una vía compleja de proteínas integradas en la membrana interna. Este complejo de proteínas de membrana permite a los protones volver a la matriz sólo si se añade un grupo fosfato al compuesto adenosín difosfato (ADP) para formar ATP en un proceso llamado fosforilación oxidativa.

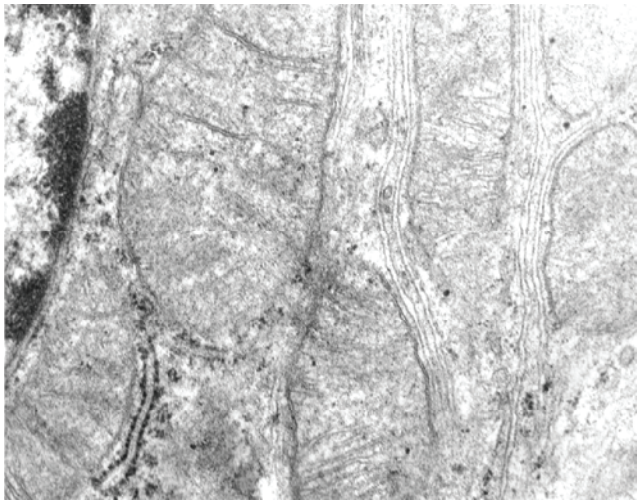
El ATP se libera en el citoplasma de la célula, que lo utiliza prácticamente en todas las reacciones que nece-

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org



A



B

Figura 3-31. Micrografías electrónicas de mitocondrias. En ambos casos (***A***, ***B***) se observan su morfología alargada y las crestas mitocondriales (flechas). MET. ***A.*** 15 000 X. ***B.*** 50 000 X.

sitan energía. Se convierte en ADP, que la célula devuelve a la mitocondria para volver a fosforilarlo.

Las mitocondrias presentan estrechas asociaciones topográficas con los elementos del RE, lo cual se debe a las necesidades de este último de recibir, para su proceso de síntesis, la energía producida por ellas.

En la división celular, sobre todo en periodos de intensa multiplicación, las mitocondrias se adosan a la membrana nuclear. Éstas reciben del núcleo un estímulo para su multiplicación, el cual puede ser RNA o coenzimas necesarias para ellas.

Las mitocondrias se pueden observar mediante técnicas histológicas especiales o mediante el microscopio electrónico, y se pueden aislar por ultracentrifugación. Están presentes y repartidas de modo uniforme en todas las células y se hallan en continuo movimiento.

Dentro de la matriz mitocondrial no sólo hay un genoma mitocondrial (mtDNA), sino que también existen RNA ribosomal, RNA de transferencia y RNA mensajero, ya que son las macromoléculas implicadas en la traducción de la información codificada por el mtDNA. Su DNA no está encerrado en una membrana nuclear, sino que aparece como agregados laxos, de finos filamentos en la matriz mitocondrial.

Las mitocondrias evolucionaron a partir de bacterias aerobias que fueron incorporadas a células eucariotas. Se encuentran en todas las células animales, con excepción de los eritrocitos y los queratinocitos terminales del estrato córneo de la piel.

Cuando una célula se divide, las mitocondrias se reproducen con independencia del núcleo. Las dos células hijas formadas después de la división reciben cada una la mitad de mitocondrias. El tiempo de vida media de las mitocondrias es de casi una semana, dependiendo del tipo celular, por lo que tienen que tener una constante duplicación.

Las mitocondrias son organelos semiautónomos y autoduplicables por fisión binaria. En la matriz se encuentra DNA de tipo procariota, el cual codifica para 13 proteínas mitocondriales. En la misma mitocondria se realiza la síntesis de esas proteínas sobre ribosomas de tipo procariota, aunque la mayoría de las proteínas mitocondriales (más de 600) se sintetizan en el citoplasma (figuras 3-30 y 3-31).

Funciones

En la mitocondria se realizan oxidaciones de moléculas orgánicas, utilizando O_2 como último aceptor de electrones, con el objeto de obtener energía electroquímica para otros procesos celulares. En la matriz mitocondrial son oxidados el ácido pirúvico, los ácidos grasos y algunos aminoácidos. Los electrones que provienen de estas oxidaciones son transferidos hasta el último aceptor a través de una serie de coenzimas y citocromos llamados colectivamente cadena respiratoria. Los componentes de la cadena respiratoria están asociados a la membrana interna mitocondrial.

La transferencia de electrones hasta el O_2 está acoplada en varios puntos a la reacción de formación de ATP. Los elementos necesarios para la fosforilación oxidativa se encuentran ligados a los conjuntos respiratorios de las membranas de las crestas mitocondriales. En la mitocondria también se lleva a cabo la beta-oxidación de los ácidos grasos.

www.elsolucionario.org

La célula necesita energía para crecer y multiplicarse, y las mitocondrias aportan casi toda esta energía realizando las últimas etapas de la descomposición de las moléculas de los alimentos. Estas etapas finales consisten en el consumo de oxígeno y la producción de dióxido de carbono, proceso llamado respiración, por su similitud con la respiración pulmonar. Sin mitocondrias, los animales y los hongos no serían capaces de utilizar oxígeno para extraer toda la energía de los alimentos y mantener con ella el crecimiento y la capacidad de reproducirse. Los organismos anaerobios viven en medios sin oxígeno y carecen de mitocondrias. Las mitocondrias son el motor de la célula; su número en una célula depende de la función de ésta. Por su parecido con las bacterias aeróbicas (es decir, que necesitan oxígeno), se cree que han evolucionado a partir de una relación simbiótica o de cooperación entre una bacteria aeróbica y una célula ucariota ancestral (intermedia entre procariota y eucariota).

Adenosín trifosfato (ATP)

El ATP es la molécula que interviene en todas las transacciones de energía que se llevan a cabo en las células; por esta razón se le ha llamado moneda universal de energía. El ATP está formado por adenina, ribosa y tres grupos fosfato, y contiene enlaces de alta energía entre los grupos fosfato; al romperse dichos enlaces se libera la energía almacenada. El alimento ingerido se oxida para producir electrones de alta energía que se convierten en energía almacenada. Esta energía es almacenada en enlaces fosfato de alta energía en una molécula de ATP. El ATP proviene de convertir el adenosín difosfato, o ADP, mediante la adición de un grupo fosfato con un enlace de alta energía. En la mayoría de las reacciones celulares el ATP se hidroliza a ADP, rompiéndose un solo enlace y quedando un grupo fosfato libre (P), que suele transferirse a otra molécula en lo que se conoce como fosforilación; sólo en algunos casos se rompen los dos enlaces resultando AMP + dos grupos fosfato. El sistema ATP <-> ADP es el sistema universal de intercambio de energía en las células.

Hipótesis quimiosmótica

Esta hipótesis explica la síntesis de ATP en mitocondrias y cloroplastos. La energía liberada por el transporte de electrones se utiliza para bombear protones desde la matriz al espacio intermembranoso en mitocondrias, o desde el estroma al interior del tilacoide en cloroplastos. El bombeo de protones se realiza a través de transportadores localizados en complejos enzimáticos ubicados en la membrana de las crestas mitocondriales o tilacoidales.

Así pues, se genera un gradiente electroquímico de protones que ejerce fuerza protonmotriz, ya que cuando los protones atraviesan de nuevo la membrana interna (mitocondrial o tilacoidal) a favor del gradiente, lo hacen a través del sistema ATP-sintasa que se encuentra en estas membranas, donde la energía protonmotriz se transforma en energía de enlace en moléculas de ATP.

Respiración celular. De la glicólisis a la cadena de transporte de electrones

La respiración (del latín *respirare*) celular es la degradación final en la mitocondria de los nutrientes de la dieta con consumo de oxígeno. Los carbohidratos ingeridos son transformados en carbohidratos simples (glucosa) por las enzimas digestivas en el intestino. La glucosa se absorbe e ingresa en la célula mediante transportadores de glucosa (proteínas de membrana). Posteriormente, la glucosa es convertida en ATP por dos vías:

1. **Metabolismo anaerobio:** no requiere oxígeno. Esta vía se llama glicólisis (de *gluco,* dulce, y *lisis,* cortar) y se lleva a cabo en el citoplasma, fuera de la mitocondria. Durante la glicólisis de la molécula original de glucosa (seis carbonos) se obtienen dos moléculas de piruvato de tres carbonos cada una y sólo cuatro moléculas de ATP.
2. **Ciclo de Krebs o de los ácidos tricarboxílicos (ciclo del ácido cítrico):** el piruvato ingresa en la matriz de la mitocondria y se convierte en acetil Co-A, el cual entra al ciclo de Krebs. La primera reacción produce CO_2, ya que esta reacción involucra la remoción de un carbono del piruvato. Este proceso requiere oxígeno, por lo cual se llama metabolismo aeróbico. La ATP sintasa utiliza la energía del gradiente de iones hidrógeno para formar ATP a partir de ADP y fosfato. También se produce agua a partir del oxígeno e hidrógeno. Del ciclo de Krebs se obtienen de 24 a 28 moléculas de ATP.

Los ácidos grasos también entran del citosol a la matriz mitocondrial y se degradan a acetilcoenzima A. Este proceso, conocido como beta-oxidación, también ocurre en los peroxisomas.

Cadena de transporte de electrones

Esta cadena cataliza la transferencia de electrones al oxígeno para formar agua (figura 3-32). Este bombeo quimiosmótico crea un gradiente electroquímico de protones (H^+) a través de la membrana, el cual es utili-

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

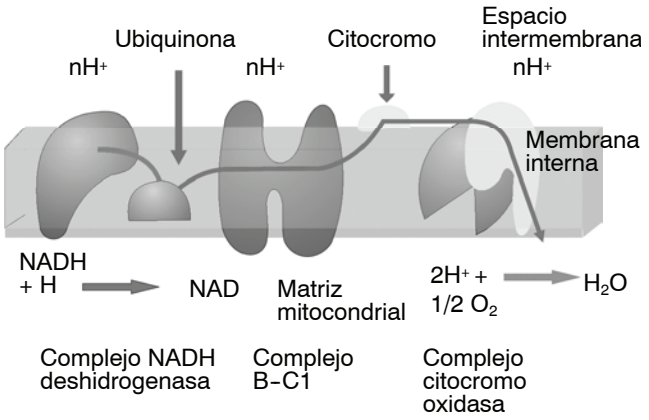


Figura 3-32. Cadena de transporte de electrones. Esta bomba cataliza la transferencia de electrones al oxígeno para formar agua. El bombeo quimiosmótico crea un gradiente electroquímico de protones a través de la membrana, el cual se utiliza para la sintasa de ATP. Cada compartimento de las mitocondrias se especializa en determinadas reacciones que proveen energía.

zado para potenciar la sintasa de ATP. Esta enzima se localiza en las partículas elementales de las crestas mitocondriales.

Durante el ciclo de Krebs se liberan los electrones, que son transportados por una cadena de oxidorreducción (cadena respiratoria). La energía de este proceso regenera ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico (fosforilación oxidativa).

Sintasa de ATP

El nicotinadenindinucleótido (NAD) y el flavinadenindinucleótido (FAD) remueven electrones que se donan durante algunos de los pasos del ciclo del ácido cítrico o de Krebs.

Estos nucleótidos transportan los electrones a las bombas de transporte de electrones y donan los electrones a las bombas; así se oxidan el NAD y el FAD, ya que pierden protones hidrógeno que donan a las bombas. Éstas, a su vez, transportan los iones hidrógeno al espacio intermembrana, donde alcanzan una concentración suficientemente alta como para servir de combustible a las bombas de ATP.

Con suficiente combustible, las bombas fosforilan el ADP (figura 3-33). De esta manera, la oxidación está acoplada con la fosforilación. Los hidrógenos que son bombeados de nuevo a la matriz mitocondrial por la bomba de ATP se combinan con el oxígeno para formar agua.

Si no existiera oxígeno, los iones de hidrógeno se acumularían, y el gradiente de concentración requerido para activar las bombas de ATP sería imposible.

Genoma mitocondrial

El genoma mitocondrial humano está constituido por un solo cromosoma, que es una molécula circular de DNA del tamaño de 16 569 pares de bases, 8 000 veces menor que el cromosoma 5. El genoma humano tiene 3 000 000 000 pb, = 3 000 000 kb = 3 000 Mb, mientras que el genoma de *E. coli* mide 4 639 kb. Este tamaño de 16 569 pb corresponde al primer DNA que se secuenció (secuencia Cambridge).

Otras variantes tienen distinto tamaño; el DNA mitocondrial secuencia africana tiene 16 559 pb, mientras que la secuencia sueca tiene 16 570 pb. La mayoría de las células tienen varios cientos de mitocondrias y éstas, a su vez, contienen varias moléculas de DNA, con lo que el número de copias del cromosoma circular de cada célula es de varios miles.

El mtDNA contiene 37 genes: 13 genes que codifican para RNAs mensajeros y, por lo tanto, para 13 proteínas; 22 genes que codifican para los 22 tRNAs y dos genes que codifican para los dos rRNAs mitocondriales. En el genoma mitocondrial se encuentran codificadas 5% de las proteínas que participan en el metabolismo de las mitocondrias, que son más de 700, lo que implica que

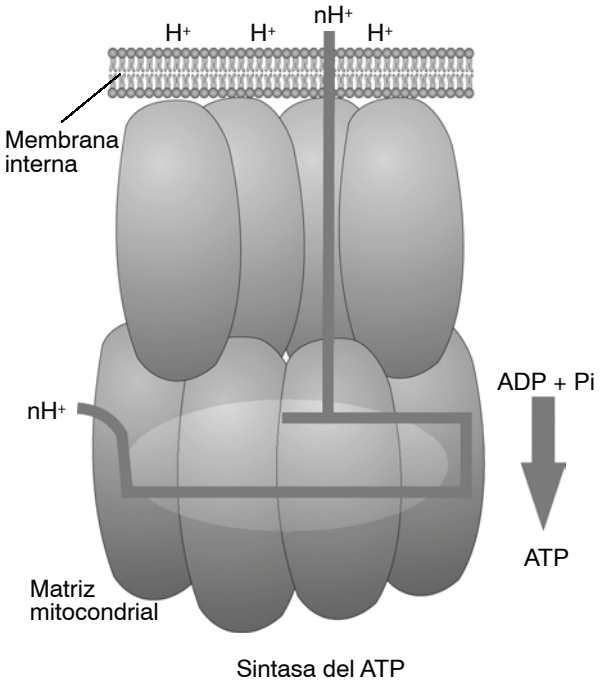


Figura 3-33. Esquema de la sintasa de ATP. Esta enzima se encuentra en todas las células, es una proteína integral (transmembranal). Transporta corriente eléctrica (es electrogénica), en reposo contribuye a 45% de los gastos energéticos del ser humano y también es responsable de las concentraciones intracelulares y extracelulares de Na^+ y K^+.

www.elsolucionario.org

la mayoría de los genes cuyas proteínas participan en el metabolismo mitocondrial son de origen nuclear.

En la molécula de DNA circular mitocondria las dos cadenas complementarias tienen una proporción de C y G dispares, y por ello tienen un peso molecular muy distinto. Para diferenciarlas se denominan cadena H o pesada *(heavy)* y cadena L o ligera *(light)*.

La cadena L tiene una composición en bases (16 569 bases): 5 122 A; 5 180 C; 2 171 G; 4 096 T. Peso molecular: 5 060 609 Daltons. La cadena H tiene una composición en bases (16 569 bases): 4 096 A; 2 171 C; 5 180 G; 5 122 T. Peso molecular: 5 168 726 Daltons. La cadena que por convenio se representa y sobre la que se realiza la numeración del genoma mitocondrial es la cadena L. La numeración se realiza de 1 a 16 569, sin valores negativos, a diferencia de lo que ocurre en los genes nucleares.

Estos genes no se encuentran todos sobre la misma cadena codificadora, sino que existen genes localizados sobre ambas cadenas (H y L). Cada una tiene su propio origen de replicación y de transcripción. Cada cadena se transcribe "en una sola pieza", es decir, se produce una sola molécula de RNA, que se denomina transcrito primario de esa cadena. Entre los genes que se encuentran codificados en el mtDNA están NADH deshidrogenasa, citocromo oxidasa, ATPasa subunidad 6 (ATPasa 6), subunidad 8 (ATPasa 8), citocromo b, etc. En febrero de 2001 se describieron los seudogenes mitocondriales humanos. Estos seudogenes son una copia casi completa del genoma mitocondrial humano en el cromosoma 17. Es decir, se tiene también el genoma mitocondrial dentro del núcleo. Sin embargo, estos genes no se expresan, por lo que se llaman seudogenes; este hecho confirma el flujo de la información genética entre el núcleo y las mitocondrias.

Investigación reciente sobre las mitocondrias

La utilidad del DNA mitocondrial como un marcador de gran fiabilidad en antropología molecular para el estudio de la evolución humana, los flujos migratorios, etc., se extiende a la ciencia forense, por su valor como marcador en la identificación de personas o el esclarecimiento de relaciones de parentesco. Entre los mamíferos, las mitocondrias tienden a seguir una línea de herencia materna. Cuando el espermatozoide fecunda al óvulo, sus mitocondrias quedan fuera del huevo. El cigoto fecundado hereda sólo las mitocondrias de la madre. Esta herencia materna crea un árbol familiar que no se ve afectado por la recombinación de genes que tiene lugar entre el padre y la madre; por ello, la secuencia de nucleótidos del mtDNA se utiliza para estudios de genética de poblaciones. Una comparación reciente de muestras de mtDNA humano sugiere que la humanidad desciende de una mujer que vivió en África entre 140 000 y 200 000 años atrás (la Eva mitocondrial). Muestras genéticas tomadas de grupos étnicos africanos, asiáticos, australianos, europeos y de Nueva Guinea han revelado un número específico de tipos de mtDNA. La comparación de estos tipos ha permitido la construcción de un árbol genealógico que sugiere que los distintos grupos empezaron probablemente a evolucionar por separado. En este árbol, el mtDNA africano ocupa la rama más larga y antigua, y de ella brotan los demás grupos étnicos. Probablemente había muchas otras mujeres vivas en la época de la llamada Eva mitocondrial, pero sus líneas de herencia materna se han extinguido. Esto ocurre comúnmente cuando alguna generación de una familia no produce ninguna hija.

Más de 50 enfermedades genéticas metabólicas se deben a mutaciones puntuales consistentes en la sustitución de unas bases por otras, afectando a distintos genes del genoma mitocondrial. Existen varios cientos de mutaciones no puntuales, como son las reordenaciones genéticas del tipo de las deleciones o inserciones de fragmentos de DNA de distinto tamaño.

La bioquímica metabólica ha acrecentado los conocimientos acerca del papel central de la mitocondria en el metabolismo celular. Al mismo tiempo se han clarificado definitivamente los aspectos bioenergéticos de la mitocondria en relación con el transporte de electrones, la fosforilación oxidativa y el necesario acoplamiento de ambos procesos.

El análisis del mtDNA se aplica también en la investigación forense. Recientemente se ha establecido la identidad de unos esqueletos atribuidos a Nicolás II, último zar de Rusia, y a su familia; utilizando mtDNA obtenido de un pariente vivo de la familia del zar, resultó ser idéntico al encontrado en los restos de Alejandra de Rusia, esposa de Nicolás, y de tres de sus hijos. Como el mtDNA se hereda por línea materna, el del esqueleto del zar no coincidía con el hallado en los restos de la zarina y de sus hijos. Las mitocondrias se utilizan para buscar los ancestros de organismos eucariotas.

En la apoptosis o muerte celular programada se libera el citocromo C al espacio intermembranal mitocondrial; esto ocasiona pérdida del potencial de membrana y desestabilización de la membrana externa de la mitocondria. En el citosol, el citocromo C se une al apoptosoma (Apaf-1) y, una vez unido, recluta y activa la procaspasa 9, la cual puede a su vez activar otras caspasas.

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

La familia de proteínas Bcl-2 (protooncogén del linfoma de los linfocitos B) controla la apoptosis mediante la regulación de la permeabilidad mitocondrial y la liberación de citocromo C. Algunos miembros de la familia Bcl-2, como el propio Bcl-2 y Bcl-XL, son antiapoptósicos porque se encuentran en la membrana externa de la mitocondria e inhiben la liberación de citocromo C. El efecto antiapoptósico de Bcl-2 implica el bloqueo de Bax y la inhibición de la liberación de citocromo C desde la mitocondria.

Bcl-XL inhibe la apoptosis mediante la interacción con Apaf-1, lo que bloquea la formación del complejo Apaf-1/procaspasa 9.

Los miembros proapoptósicos de la familia Bcl-2, como Bcl-XS, Bad, Bid y Bax, actúan promoviendo la liberación de citocromo C.

Estos miembros que inducen el daño en la mitocondria son citosólicos, pero se translocan a ésta ante un estímulo de estrés.

LAMINILLAS ANILLADAS

Algunos tipos celulares tienen en su citoplasma estructuras membranosas que parecen fragmentos de la envoltura nuclear. Estas laminillas anilladas están constituidas por pares de membranas paralelas que cierran una cavidad cisternal de 30 a 50 nm de ancho. A intervalos regulares de 100 a 200 nm, las membranas se continúan una con otra alrededor de una ventana circular o poro de 50 nm de diámetro, labrado en la cisterna. Estos poros están ocupados por un material denso en forma de anillo cilíndrico que forma una prominencia en cada uno de los lados de la membrana. De hecho, las laminillas anilladas son cisternas rodeadas de membrana, atravesadas por complejos de poros espaciados uniformemente e idénticos a los de la envoltura nuclear. Con frecuencia se apilan en conjuntos paralelos con los poros de las laminillas vecinas, alineados de modo regular. En sus extremos, las laminillas se continúan con frecuencia con cisternas del RER. Las laminillas fueron consideradas antes como resultado del desprendimiento de parte de la envoltura nuclear, pero ahora se sabe que se originan independientemente en el citoplasma y, a menudo, a cierta distancia del núcleo. Pueden estar implicadas en la síntesis de polirribosomas o de sus subunidades. Las laminillas tienen una función semejante en la activación y el montaje de macromoléculas informacionales almacenadas en el citoplasma, y se encuentran con mayor frecuencia en las células germinales gonadales.

CITOESQUELETO

Es el esqueleto o sostén de la célula, y está compuesto por proteínas fibrosas, filamentos y túbulos de diversos tamaños. Los microtúbulos tienen un papel primordial en la división celular, mientras que los filamentos de actina intervienen en la división celular y la motilidad.

El citoesqueleto también tiene la función de transportar vesículas. En preparaciones comunes de microscopia, en luz visible o electrónica, el citoesqueleto es invisible.

Aunque no se dibuja de manera general en los esquemas de la célula, es un componente importante, complejo y dinámico. El citoesqueleto mantiene la forma de la célula, fija a los organelos en su sitio y mueve parte de la célula en los procesos de crecimiento y motilidad. Esta función bien podría darle el nombre de citomusculatura, ya que es el responsable del desplazamiento de ciertas células sobre un sustrato y de la contracción muscular. También provee la maquinaria para los movimientos intracelulares, como el transporte de organelos de un lugar a otro en el citoplasma, y de los cromosomas en la división celular.

Las bacterias carecen de citoesqueleto, hecho que pudo haber sido un factor clave en la evolución de las células eucariotas. Los filamentos de proteína que forman el citoesqueleto son polímeros formados por subunidades de proteínas globulares, que se clasificaron de acuerdo con su tamaño relativo.

Existen tres tipos de filamentos que conforman el citoesqueleto de las células eucariotas. Los microfilamentos, de 7 nm de diámetro, también son conocidos como filamentos de actina. Los filamentos intermedios se forman con subunidades de proteínas fibrosas, tienen un diámetro de 7 a 11 nm y son más estables que los microtúbulos y los microfilamentos. Los microtúbulos miden 25 nm de diámetro. Los tres componentes del citoesqueleto se interconectan en un reticulado que se extiende desde la superficie celular hasta el núcleo. El citoesqueleto se encuentra en las células de todos los eucariotas y proporciona integridad tensional *(tensegrity)*. De esta manera, las fuerzas de compresión y tensión se distribuyen y equilibran dentro de las células. Los tres tipos de filamentos dependen de proteínas accesorias para realizar su función, ya que éstas unen los filamentos entre sí y con los demás componentes celulares. Las proteínas accesorias también controlan el ensamble de los filamentos en determinadas ubicaciones y proporcionan los motores que mueven los organelos a lo largo de los filamentos (figura 3-34).

www.elsolucionario.org

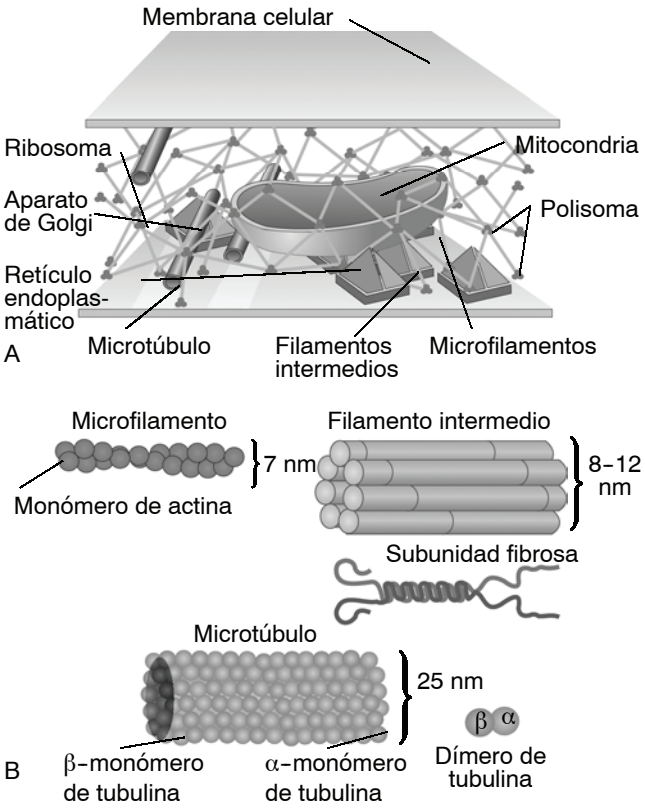


Figura 3–34. El citoesqueleto es el esqueleto o sostén de la célula y está compuesto por proteínas fibrosas, filamentos y túbulos de diversos tamaños. Los microtúbulos tienen una función primordial en la división celular, mientras que los filamentos de actina intervienen en la división celular y en la motilidad. ***A.*** Esquema del citoesqueleto. ***B.*** Esquema de los componentes del citoesqueleto.

Microfilamentos (filamentos de actina)

Los microfilamentos son fibras sólidas compuestas del homopolímero actina globular o gamma-actina. Existen diferentes tipos de actinas relacionadas estructuralmente. Las alfa-actinas se encuentran en las células musculares, mientras que las beta-actinas y gamma-actinas, en células no musculares. Los microtúbulos del citoplasma funcionan individualmente y los microfilamentos o filamentos de actina trabajan en redes o en grupo. Los filamentos de actina se localizan debajo de la membrana plasmática y están entrecruzados por varias proteínas específicas que forman el córtex o corteza celular.

Los filamentos de actina participan en los movimientos celulares asociados con la superficie celular. Su acumulación produce protrusiones como microespigas o proyecciones lameliformes (lamelipodios); también forma invaginaciones de la membrana celular al comienzo de la citocinesis.

Al igual que los microtúbulos, los microfilamentos tienen un extremo positivo que crece rápidamente y uno negativo que crece con más lentitud. La polimerización de los microfilamentos está regulada por proteínas que se asocian con las moléculas libres de actina, el factor despolimerizante de actina (FDA) y la timosina, que inhiben la polimerización, mientras que la profilina la favorece.

Estos filamentos crecen por adiciones sucesivas de monómeros de actina al extremo terminal. La polimerización requiere energía; la actina está unida al ATP o al ADP y cataliza la hidrólisis del ATP. La fibra de ATP-actina tiene mayor tendencia a polimerizarse que la de ADP-actina. Algunas moléculas de actina no se polimerizan debido a la presencia de proteínas de control que se unen a ésta. La citocalasina es un alcaloide extraído del hongo *Helminthosporium dematoiderum,* que inhibe el ensamblaje de los filamentos de actina. En células tratadas con citocalasina desaparecen los microfilamentos y se inhibe la citocinesis, fagocitosis, pinocitosis, exocitosis, retracción del coágulo hecho por las plaquetas, crecimiento de los axones ganglionares, etc.

La paloidina, un veneno extraído de la *Amanita phalloides,* se une a los monómeros de actina de los microfilamentos, impidiendo su polimerización; las consecuencias son similares a las que se pueden observar con citocalasina.

Las proteínas motoras de los filamentos de actina son miosinas. Las miosinas musculares pertenecen a la subfamilia de la miosina II, compuesta de dos cabezas y una cola en forma de varilla. Cada una de las cabezas tiene un sitio de unión al ATP y otro para unirse a la actina. A su vez, cada cabeza se asocia con dos cadenas livianas. La cola en forma de varilla permite que las moléculas polimericen en filamentos bipolares, para que se desplacen sobre sí mismos durante la contracción muscular.

Las células no musculares contienen la miosina I. Esta miosina también es una proteína motora; su cola mueve un filamento de actina sobre otro, una vesícula a través de un filamento de actina o un filamento de actina sobre el plasmalema. La miosina II forma ensamblajes transitorios en células no musculares, como el anillo contráctil que se forma entre la telofase y citocinesis.

Filamentos intermedios

Se localizan principalmente en las células epiteliales animales y son resistentes a la desintegración. Sus subunidades son proteínas fibrosas que tienen una cabeza amino terminal, una cola carboxilo terminal y un núcleo de alfa hélices de doble o triple hebra, superenrollados, con las hélices dispuestas en forma paralela; este dímero

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

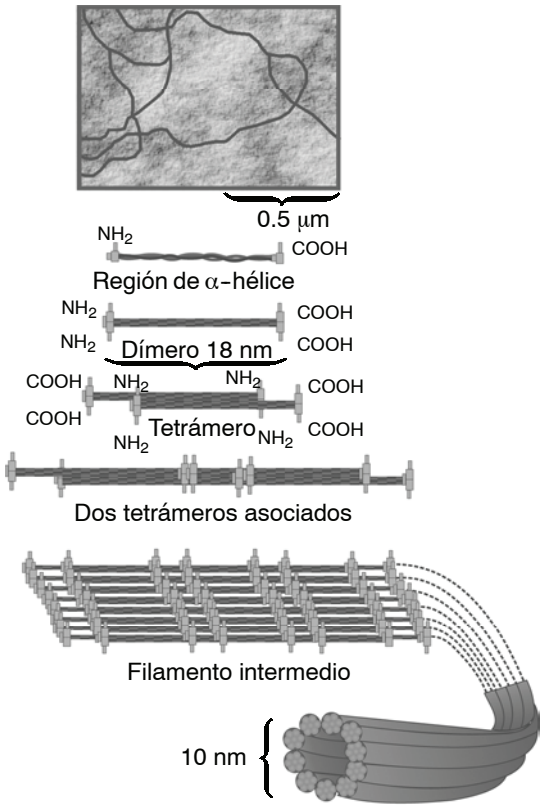


Figura 3-35. Filamentos intermedios. Miden en promedio 10 μm de diámetro y 300 aminoácidos de longitud. Sus subunidades son proteínas fibrosas que tienen una cabeza amino terminal, una cola carboxilo terminal y un núcleo de alfa hélices de doble o triple hebra, superenrollados, con las hélices dispuestas en forma paralela; este dímero se aparea con otro dímero en posición antiparalela, constituyendo un tetrámero, el cual forma la subunidad fundamental.

se aparea con otro dímero en posición antiparalela, constituyendo un tetrámero. Éste constituye la subunidad fundamental y ambos se asocian para formar largas fibras de unos 300 residuos de aminoácidos de longitud (figura 3-35). La principal función de los filamentos intermedios citoplasmáticos es proporcionar resistencia a las células ante el estrés mecánico, debido a la estructura de tetrámeros que se superponen para formar los polímeros filamentosos.

Intervienen en la estructura de la membrana nuclear y desde allí pueden irradiar y asociarse con los microtúbulos. Existe un gran número de proteínas asociadas con el citoesqueleto que controlan su estructura, tanto por medio de la orientación y direccionamiento de los grupos de filamentos como del movimiento de los mismos. Algunos son los motores celulares, como la miosina, que mueve filamentos de actina, y la quinesina, que mueve microtúbulos. Las neuronas contienen neurofilamentos; los músculos, filamentos de desmina.

Existen tres tipos de filamentos intermedios citoplasmáticos (queratinas, vimentinas y neurofilamentos) y uno nuclear (láminas).

Los filamentos intermedios se clasifican según la proteína que los compone, y los principales son:

1. Queratinas.
2. Desmina.
3. Vimentina.
4. Neurofilamentos.
5. Láminas nucleares.
6. Proteína ácida fibrilar glial (PAFG).
7. Nestina.

Queratinas

Las queratinas son una familia de 20 tipos diferentes en las células epiteliales y ocho en pelos y uñas. A estas queratinas se les denomina alfa para diferenciarlas de las betaqueratinas de las alas de los pájaros, que tienen una estructura diferente. Contribuyen a la estabilidad mecánica de las células epiteliales y constituyen la proteína más abundante de la piel, de pelos y uñas. Las queratinas del pelo son un ejemplo representativo de proteínas de los filamentos intermedios.

Vimentina

Son filamentos intermedios que se forman con polímeros de un solo tipo de proteína, como es el caso de los filamentos de vimentina en fibroblastos, células endoteliales y leucocitos, de los filamentos de desmina en células musculares y de los neurofilamentos de los axones.

Lámina nuclear

Son filamentos intermedios nucleares. Están compuestos de láminas que constituyen la capa interna de proteína que se encuentra en la cara interna de la membrana nuclear interna, conocida como lámina nuclear.

Microtúbulos

Su nombre deriva del latín *micros,* pequeño, y *tubos,* caño, conducto. Son conductos huecos y alargados compuestos por moléculas de tubulina, cada una de las cuales es un dímero de dos polipéptidos globulares: alfa-tubulina y beta-tubulina; estas subunidades semejantes pesan 50 kDa. Los dímeros de tubulina están asociados en 13 protofilamentos lineales que constituyen las paredes del microtúbulo. Cada microtúbulo tiene un extre-

www.elsolucionario.org

mo *minus* que crece lentamente y un extremo *plus* que crece a mayor velocidad. La cinética de crecimiento de un microtúbulo se inicia con una etapa de nucleación en la que los monómeros de tubulina se ensamblan en oligómeros. Después de la etapa de crecimiento logarítmico se estabilizan en un tamaño definido, determinado por el equilibrio entre la velocidad a la que se incorporan nuevas unidades de tubulina y la velocidad a la que se desensamblan otras, ya que los microtúbulos se polimerizan y despolimerizan constantemente. Su vida media es de 10 min en los fibroblastos, mientras que la vida media de una molécula de tubulina aislada es de 20 h.

La mayor parte de los microtúbulos sufren una rápida asociación y disociación. El rápido recambio de los microtúbulos se debe a la hidrólisis de GTP unido a tubulina. La GTP-tubulina se adhiere al extremo positivo de los microtúbulos para hidrolizar al GTP unido. Cuando la velocidad de adición de GTP-tubulina en el extremo positivo es más rápida que la velocidad de hidrólisis del GTP enlazado, el microtúbulo crece en longitud. Mare Kirschner y Tim Mitchison encontraron que algunos microtúbulos se alargaban en tanto que otros se acortaban. Esta propiedad, denominada inestabilidad dinámica, se debe a las fluctuaciones aleatorias y depende de que el extremo positivo contenga GTP-tubulina o GDP-tubulina.

La inestabilidad dinámica de los microtúbulos resalta en la formación del huso mitótico. Los microtúbulos conectan cada uno de los polos del huso mitótico a los cinetocoros (centros de unión localizados en los centrómeros de los cromosomas hijos). Los COMT (véase más adelante) situados en los dos polos no envían de forma direccional los microtúbulos hacia los cinetocoros, sino que de los polos emanan centenares de microtúbulos orientados al azar. Los microtúbulos que alcanzan a los cinetocoros se estabilizan, mientras que los demás se desintegran porque no tienen sus extremos positivos protegidos. En esta inestabilidad dinámica sólo se estabilizan los microtúbulos comprometidos en interacciones constructivas.

La estabilización del microtúbulo y su funcionalidad aumentan con las proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs), que unen uno de sus extremos al microtúbulo y el otro a algún componente celular. Para que los microtúbulos actúen como marco estructural o para que intervengan en los movimientos celulares, deben anclarse a ciertas partes de la célula. En una célula que no esté en división, el centro de nucleación es el centrosoma, también conocido como centro celular o centro de organizador de microtúbulos (COMT).

El extremo negativo del microtúbulo es el que se une al COMT, mientras que el extremo positivo está libre. Los microtúbulos de las células se originan de los centrosomas. En la célula en división el centro de nucleación son los polos del huso mitótico, mientras que en los cilios y flagelos es el cuerpo basal.

En el centrosoma de casi todas las células animales se localizan los centriolos, dispuestos en ángulo recto uno respecto al otro. Durante la interfase, el centrosoma se divide y da origen a un nuevo par de centriolos. Rodeando al par de centriolos, tanto en metafase como en interfase, se encuentra la matriz centrosomal o región pericentriolar formada por una red de pequeñas fibras de alfa, beta y gamma-tubulinas necesarias para iniciar la formación de microtúbulos. En las plantas no existen centriolos, pero se observa la presencia de proteínas específicas del centrosoma, como gamma-tubulina y proteínas relacionadas.

Los centriolos y los cuerpos basales están constituidos por nueve tripletes de microtúbulos, de los cuales el primero es completo con 13 protofilamentos, en tanto que los últimos poseen sólo 11.

Los microtúbulos funcionan como carriles a través de los cuales se desplazan los organelos y vesículas de un sitio a otro de la célula. Son transportados a través de la red de microtúbulos con ayuda de proteínas que requieren ATP y que actúan como motores del transporte. Estas proteínas motoras son las quinesinas y las dineínas citoplasmáticas. Las quinesinas son de varios tipos y participan en el transporte de organelos, en la mitosis, la meiosis y en el transporte de vesículas sinápticas a lo largo de los axones. Las quinesinas y las dineínas son oligómeros formados por dos cadenas pesadas y dos livianas, con una cabeza globular unida al ATP que se asocia al microtúbulo y una cola que se une a componentes específicos de la célula y, por lo tanto, define el tipo de carga que transporta la proteína. Las quinesinas generalmente se desplazan hacia el extremo *plus* del microtúbulo, alejándose del centro celular, en tanto que las dineínas lo hacen en sentido contrario (figura 3-36).

Los microtúbulos participan en el movimiento de los cromosomas, dan forma a las células y se encuentran en los axones de fibras nerviosas, cilios, flagelos y fibroblastos, entre otros.

La colchicina, un alcaloide del azafrán de otoño, es un fármaco que bloquea la polimerización de tubulina y, por ende, la formación de microtúbulos. De esta forma, las células en división se detienen en metafase porque no se forma el huso mitótico para el desplazamiento de los cromosomas. La colchicina es un potente medicamento antiinflamatorio que se utiliza para tratar los ataques agudos de gota. El taxol, que se extrae de la corteza del tejo del Pacífico, provoca el efecto contrario: estabiliza los microtúbulos de tubulina y estimula su polime-

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

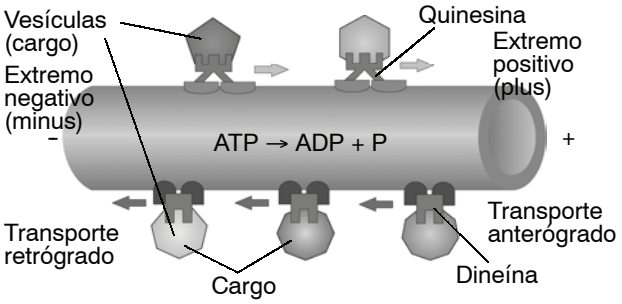


Figura 3-36. Esquema del desplazamiento de las moléculas a través de los microtúbulos. Las quinesinas se desplazan hacia el extremo *plus* del microtúbulo, alejándose del centro celular, en tanto que las dineínas lo hacen en sentido contrario.

rización. Se utiliza como fármaco antineoplásico, ya que impide la proliferación de las células que se dividen rápidamente, porque también interfiere con la inestabilidad dinámica del huso mitótico.

Proteínas asociadas a microtúbulos

El adecuado control de la dinámica microtubular es crucial para preservar la organización de estos polímeros y para su funcionamiento en diversos procesos celulares. Las proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs) también se encuentran en el sistema nervioso, se unen a tubulina y promueven el ensamblaje de los microtúbulos. Las más comunes son: MAP-1A, MAP-1B (310-320 kDa), el grupo de MAP-2A, B de alto peso molecular (270 kDa), y MAP-2C (70 kDa), MAP-4 (205 kDa), las proteínas *tau* del sistema nervioso central y encontradas también en varias líneas no neuronales (62 kDa), y la variante *heavy-tau* del sistema nervioso periférico (110 kDa). La MAP-1A y la B son productos de genes diferentes, mientras que las variantes de MAP-2 y los distintos isotipos de *tau* son generados por un proceso de *splicing* de mMRNA (empalme alternativo). La región carboxilo terminal de las isoformas de alfa y beta tubulina tiene un dominio regulatorio, sitio donde se unen todas las MAPs. A nivel celular, el ensamblaje de los microtúbulos es modulado por la interacción específica de diferentes MAPs (dependiendo del tipo celular) con este importante dominio regulatorio. Esta región de la tubulina contiene un extremo muy acídico que constituye el único segmento variable que determina las diferentes isoformas de la tubulina. Tales isoformas son el resultado de la expresión de una familia multigénica que codifica para los distintos isotipos de alfa y beta tubulina.

Las proteínas *tau* tienen una distribución amplia en varios tipos celulares, además de las neuronas donde existe una evidente compartimentalización: *tau* es un componente axonal, mientras que MAP-2 tiene una distribución preferente en las dendritas. La función de las MAPs como mediadoras de las interacciones entre microtúbulos y los otros elementos del citoesqueleto sería determinante para definir patrones de organización de esta red arquitectónica en respuesta a las diferentes demandas morfogenéticas de la célula. Los equilibrios de asociación-disociación de *tau* (y otras MAPs, como MAP-1B) a microtúbulos y microfilamentos intervienen en la integridad, organización espacial y estabilidad de la red del citoesqueleto. Las MAPs estabilizan los microtúbulos al disminuir la frecuencia de catástrofe y aumentar la frecuencia de rescate, lo cual se traduce en un aumento en la población de tubulina polimerizada.

La proteína *tau* tiene un efecto supresor de la catástrofe produciendo un incremento en la velocidad de elongación del microtúbulo. Además de inducir el ensamblaje de microtúbulos, las MAPs participan en la formación de puentes moleculares que los unen con filamentos de actina y con filamentos intermedios. La esencialidad de las MAPs en un tejido específico parece ser relativa, pues se han generado ratones transgénicos *knockouts* en la proteína *tau* (significa que artificialmente se les alteró para que no expresaran este gen), los cuales son viables y alcanzan la vida adulta. En ausencia de *tau,* la MAP-1B asume sus funciones.

La proteína Mip-90 se concentra en los lamelipodios asociados a redes locales de actina, desde donde contribuye con los procesos migratorios celulares. Esta proteína no comparte características estructurales con las MAPs conocidas. Mip-90 interactúa con el sistema microtubular como MBD-205 encontrada en contactos focales. La proteína DMAP-85 es una MAP de la mosca *Drosophila melanogaster.* De manera similar a la *tau,* DMAP-85 se asocia a tubulina y actina. Induce en forma eficiente el ensamblaje de microtúbulos y filamentos de actina durante el curso de la embriogénesis. Las proteínas *tau* son clave en la integridad de la polaridad neuronal y en la estabilización de una determinada arquitectura en la neurona diferenciada; también participan en la morfogénesis de los conos de crecimiento en las neuronas cerebrales, en cuya estructura participan redes locales de filamentos de actina. MAP-2 se relaciona con la generación de dendritas en la neurona (figura 3-37).

Alteraciones de la proteína *tau* y enfermedades neurodegenerativas

Taupatías

Son enfermedades neurodegenerativas asociadas a la presencia de ovillos de *tau.* Son enfermedades de tipo

www.elsolucionario.org

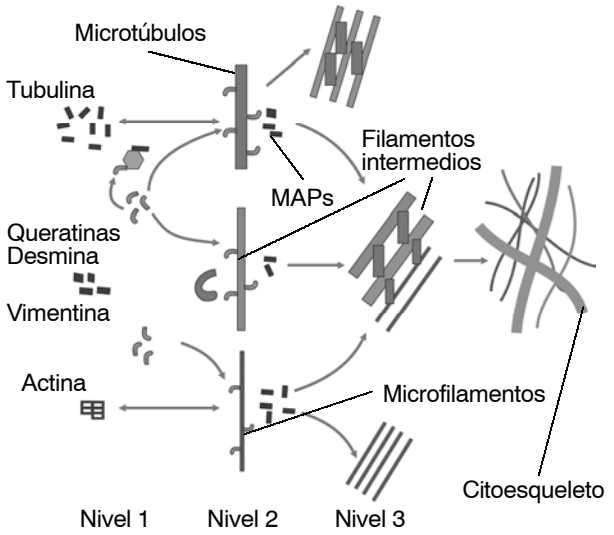


Figura 3-37. Esquema de una jerarquía en niveles de integración del citoesqueleto, en el que se muestra la polimerización de microtúbulos, filamentos de actina y filamentos intermedios, y la participación de las MAPs como mediadores de las interacciones entre estos filamentos en el citoesqueleto.

familiar y genético que presentan mutaciones en el gen de la proteína *tau* ubicado en el cromosoma 17. Las mutaciones en *tau* se han asociado con más de una docena de enfermedades neurológicas hereditarias denominadas "demencias i".

Enfermedad de Alzheimer

Es un trastorno del tejido nervioso cerebral que afecta a 10% de la población mayor de 65 años de edad. Se caracteriza por la pérdida progresiva de la memoria, disturbios en el raciocinio y en el control de los movimientos. Histopatológicamente, esta enfermedad se caracteriza por una extensa degeneración neurofibrilar y muerte neuronal asociada a la presencia de depósitos anormales de polipéptidos en forma de estructuras poliméricas. Éstos se forman como resultado de modificaciones estructurales o producto de mutaciones. Los agregados proteicos son de dos tipos:

1. **Marañas neurofibrilares en las neuronas.** Las marañas surgen luego de un largo proceso de generación de filamentos pares helicoidales de *tau.*
2. **Placas seniles en los espacios interneuronales.** Son productos muy glicosilados formados por el entrecruzamiento entre proteínas.

Los pacientes con Alzheimer tienen ambos tipos de lesiones: formación de placas y marañas neurofibrilares. Estas alteraciones pueden ser de origen esporádico o genético.

ORGANELOS NO MEMBRANOSOS

Centriolos

Los centriolos son una pareja de bastoncillos cortos, de unos 0.15 μm de diámetro y de 0.2 a 2 μm de largo. Se localizan centralmente, en una región diferenciada del citoplasma yuxtanuclear, que se denomina centrosoma o centro celular. En las células epiteliales secretoras, el centrosoma con su pareja de centriolos se localiza en el citoplasma supranuclear y queda rodeado de forma parcial por el complejo de Golgi (figura 3-38). Los centriolos participan en la formación de cilios. Aparecen en grupos de dos, denominados en conjunto diplosoma. Mediante microscopia electrónica se observa que cada centriolo tiene la forma de un cilindro hueco de unos 400 nm de largo por 150 nm de diámetro. Su pared está compuesta por nueve subunidades, cada una de las cuales tiene a su vez tres subunidades menores tubulares compuestas de microtúbulos que transcurren en dirección paralela a la orientación longitudinal del centriolo. En cada una de las tríadas, el microtúbulo interno se denomina *a* y los dos externos *b* y *c,* respectivamente. El microtúbulo *a* está conectado con el microtúbulo *c* del grupo siguiente a través de una condensación lineal (figuras 3-39 y 3-40).

Inmediatamente antes de la división celular, los centriolos se duplican. Cada nuevo centriolo se genera cerca de una determinada zona del centriolo ya existente. Se forma primero una condensación anular, de diámetro similar al de un centriolo maduro, pero sin los grupos microtubulares de la pared. Este anillo se prolonga después hasta formar un cilindro, el procentriolo, perpendicular al centriolo maduro. Por debajo se forma la pared con las nueve tríadas de microtúbulos por polimerización de tubulinas. Una vez finalizada la duplicación de los centriolos, cada uno de los centriolos originales migra con su centriolo hijo hasta los polos nucleares opuestos, desde donde se forman los microtúbulos del huso mitótico.

Los centriolos también se encuentran como cuerpos basales, que son los sitios de formación de los cilios epiteliales. El centrosoma funciona como un centro para el anclaje de microtúbulos, denominado centro organizador de microtúbulos (COMT).

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

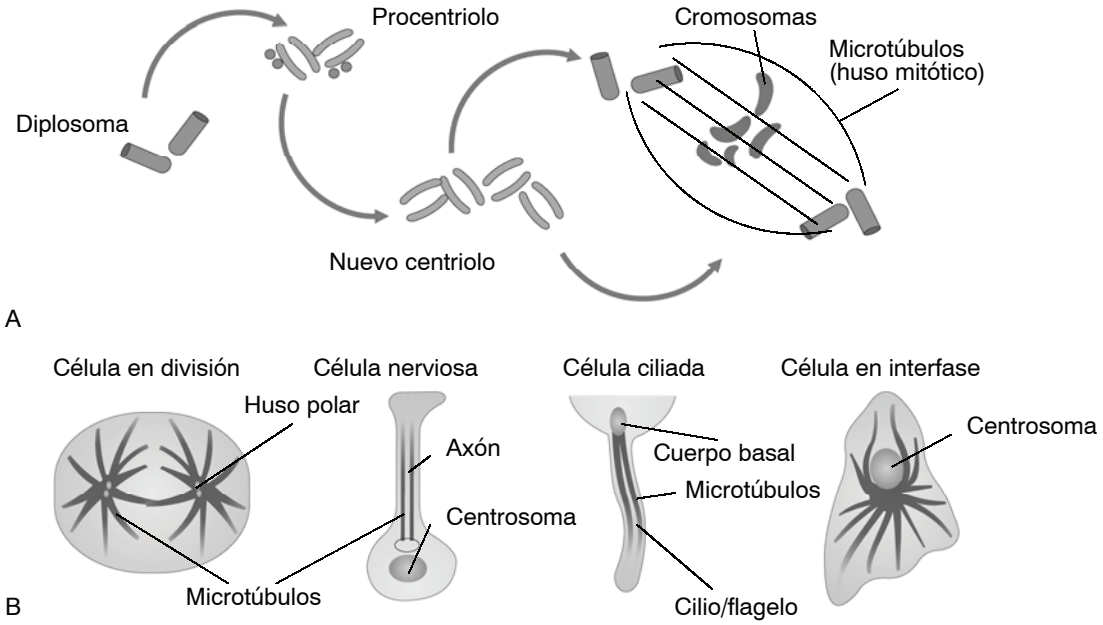


Figura 3-38. ***A.*** Esquema de la formación de centriolos antes de la división celular. Los centriolos son una pareja de 0.15 μm de diámetro y de 0.2 a 2 μm de largo. Se localizan en el centrosoma o centro celular y aparecen en grupos de dos, denominados en conjunto diplosoma. ***B.*** Relación de los centriolos con los microtúbulos en diversas células.

Cilios y flagelos

Son delgadas prolongaciones celulares móviles que presentan entre sí la misma estructura; la diferencia entre ellos es que los cilios son muchos y cortos, mientras que los flagelos son pocos y más largos. Constan de dos partes: una externa, que sobresale de la superficie de la célula, está recubierta por la membrana plasmática y contiene un esqueleto interno de microtúbulos llamado axonema, y otra interna, que se denomina cuerpo basal y del que salen las raíces ciliares que participan en la coordinación del movimiento (figuras 3-39 y 3-40).

Los cilios y los flagelos son organelos parecidos al cabello que emergen de la superficie celular. Las células libres, como los protozoarios o el espermatozoide, son impulsadas por cilios o flagelos. Los cilios y los flagelos se componen de un manojo de fibras llamado axonema. Si una célula tiene sólo uno o unos cuantos apéndices más o menos largos en proporción con el tamaño de la célula, se denominan flagelos, pero si tiene muchos apéndices cortos se denominan cilios. Tanto los cilios como los flagelos los utilizan las células para moverse a través de un medio acuoso o para mover líquidos y partículas a través de la superficie celular.

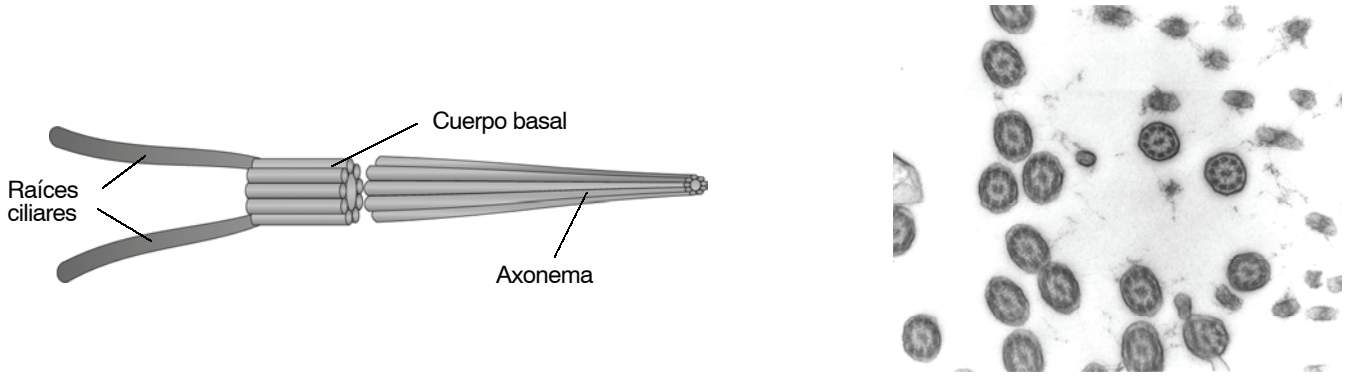


Figura 3-39. ***A.*** Estructura de un flagelo. Son delgadas prolongaciones celulares móviles que presentan la misma estructura; la diferencia entre ellos es que los cilios son muchos y cortos, mientras que los flagelos son pocos y más largos. ***B.*** Cilios. MET 30 000 X.

www.elsolucionario.org

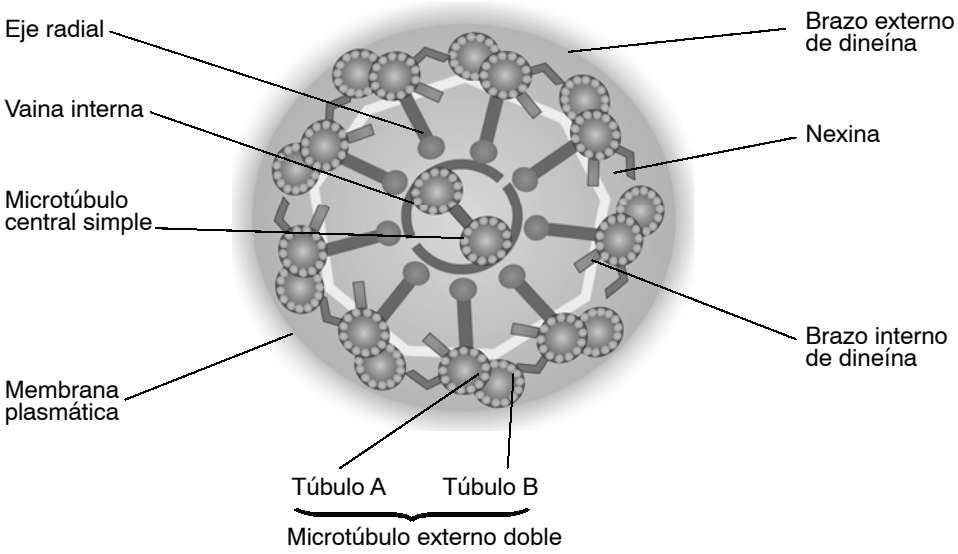


Figura 3-40. Axonema compuesto por nueve pares de fibras exteriores y dos fibras centrales (9 + 2). Los nueve dobletes externos simulan un número 8. Los brazos de dineína tienen actividad ATPásica. La hidrólisis del ATP produce ADP-Pi-dineína, que se une de nuevo a la subfibra adyacente, y se produce la liberación de Pi para iniciar el movimiento. De esta forma, la subfibra A de un doblete migra hacia la subfibra B de un doblete adyacente cuando el ATP se hidroliza.

Estas estructuras con frecuencia se encuentran en organismos unicelulares y en organismos multicelulares pequeños. En los animales se encuentran flagelos en las células espermáticas, formando la cola de éstas, y cilios en la superficie de las células del epitelio respiratorio, entre otras.

Cada cilio o flagelo tiene un axonema, cubierto por la membrana plasmática. El centro del haz contiene un grupo de microtúbulos dispuestos en nueve pares que forman la circunferencia, y dos túbulos más en el centro. Los pares están constituidos por un microtúbulo completo (13 filamentos) y uno incompleto (11 filamentos).

Esta disposición de 9 (pares) + 2 es característica de todos los cilios y flagelos de las células eucariotas (figura 3-40).

Los microtúbulos de un axonema están asociados con numerosas proteínas, algunas de las cuales sirven para mantener la estructura como un todo, en tanto que otras generan las fuerzas que provocan el movimiento. La proteína motora principal es la dineína ciliar, similar a la dineína citoplasmática, ya que tiene ATP unido a la cabeza, cuya hidrólisis genera la energía necesaria para el movimiento. La cabeza se une al microtúbulo entero (el de 13 protofilamentos) y la cola se une a un par vecino. Al producirse el movimiento de la dineína hacia el extremo *minus,* el efecto que se logra es que el microtúbulo vecino se doble en el mismo sentido, iniciándose el movimiento ciliar o flagelar.

Estas proteínas utilizan la energía almacenada en el ATP, de modo que parece que los brazos de un par de microtúbulos son capaces de "caminar" a lo largo de pares vecinos; de esta manera, la estructura se inclina de un lado a otro de forma coordinada.

Los brazos de dineína (proteína con actividad de ATPasa) se pueden solubilizar tratando los cilios con detergentes.

La dineína es una proteína de 1 500 kDa que tiene tres cabezas y un tallo.

La actividad ATPasa está localizada en las cabezas en forma similar a la miosina. La unión del ATP a la dineína induce la separación de los brazos de la subfibra adyacente.

La hidrólisis del ATP ligado produce ADP-Pi-dineína, que se une de nuevo a la subfibra adyacente, y se produce la liberación de Pi (pirofosfato), generando la fuerza para el movimiento. Así, los brazos de dineína de la subfibra A de un doblete migran hacia la subfibra B de un doblete adyacente cuando el ATP se hidroliza.

En el cilio intacto, las barras radiales se oponen a este desplazamiento, lo que se traduce en flexiones locales.

INCLUSIONES CITOPLASMÁTICAS

Son los componentes celulares no indispensables, que pueden ser sintetizados por la célula o captados del medio. Son transitorios, y se clasifican en depósitos de nutrientes y pigmentos.

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

Depósitos de nutrientes

En las células animales, sólo los hidratos de carbono y los lípidos se almacenan como inclusiones, ya que las proteínas forman parte de estructuras o están disueltas en el citosol, que al degradarse movilizan aminoácidos, como en el caso de la inanición.

Hidratos de carbono

En las células animales se almacenan en forma de glucógeno. Los hepatocitos almacenan glucógeno de manera abundante y, en menor grado, las células musculares, aunque se encuentra glucógeno en pequeñas cantidades en el citoplasma de la mayoría de las células. El glucógeno no se tiñe en los cortes histológicos comunes, por lo que en los extendidos teñidos con hematoxilina y eosina (HE), por ejemplo, se distingue como pequeños espacios irregulares en apariencia vacíos dentro del citoplasma de color rojo. Se puede demostrar la presencia de glucógeno mediante la reacción de PAS o el método de carmín de Best, que tiñen de rojo el glucógeno. Mediante microscopia electrónica de preparados con contraste con citrato de plomo y acetato de uranilo se observa como partículas densas irregulares de 15 a 30 nm de diámetro cercano.

Lípidos

Éstos se almacenan como triacilgliceroles en los adipocitos (células del tejido adiposo) principalmente, pero también en casi todas las células. Los triacilgliceroles representan una reserva energética, pero los ácidos grasos también pueden ser utilizados por la célula para la síntesis de componentes estructurales ricos en lípidos, como las membranas. En los cortes histológicos comunes se extraen los triacilgliceroles durante la preparación por acción de los solventes, que dejan agujeros redondos vacíos en los sitios del citoplasma correspondientes a las gotas de lípido. La presencia de grasa se puede demostrar mediante cortes congelados fijados con formol y teñidos con los colorantes Sudán, o con fijación con osmio, que permite observar las gotas de grasa como gotas redondeadas de interior oscuro homogéneo de distinto tamaño.

Pigmentos

Su nombre deriva del latín *pigmentum,* color. El tipo y la cantidad de pigmento de un tejido determinan su color. Son sustancias coloreadas que se localizan en el interior de la célula. Se clasifican como endógenos aquéllos que se forman dentro del organismo y como exógenos los que son tomados del medio externo. Los endógenos se clasifican en dos grupos: los derivados de la hemoglobina, como bilirrubina, hematina y hemosiderina, y los no derivados de la hemoglobina, como lipofucsina y melanina. Los exógenos pueden causar alteraciones patológicas. Entre éstos se encuentran los carotenos, polvos como el carbón, etc.

Pigmentos exógenos

Los más importantes son los carotenos y el polvo de carbón. Los carotenos (del latín *carota,* zanahoria) son pigmentos vegetales amarillo rojizos. Existen varios tipos de carotenos, que varían de una planta a otra. El caroteno de la zanahoria es amarillo en su mayoría, mientras que el del jitomate tiene una tonalidad rojiza. Los carotenos son liposolubles y, después de ser captados por el organismo, se depositan en el tejido adiposo, lo cual determina su tonalidad amarillenta. El tono amarillento de la piel se debe al depósito de carotenos en los adipocitos de la dermis, además de la capa córnea de la epidermis. El polvo de carbón llega al organismo con el aire inspirado y es captado por las células fagocíticas de los alveolos pulmonares. De allí puede ser transportado por las vías linfáticas, por lo que, con la edad, los pulmones y los ganglios linfáticos adyacentes adquieren un color negro.

Pigmentos endógenos

El más importante es la hemoglobina, cuyo producto de degradación, la hemosiderina, aparece como inclusión de pigmento en ciertas células. La melanina es el pigmento de la piel. La lipofucsina está compuesta por restos no digeribles de actividad lisosómica limitados por membranas. Este pigmento es pardo (del latín *fuscus,* oscuro) y aparece como pequeños cúmulos en muchos tipos celulares, con mayor frecuencia en las células de músculo cardiaco, nerviosas y hepáticas. Emite una fluorescencia de color pardo dorado con luz ultravioleta y se tiñe moderadamente con los colorantes liposolubles. La cantidad de lipofucsina en las células aumenta con la edad y se considera que el pigmento es un producto terminal de la actividad lisosómica. La célula es incapaz de eliminarla por exocitosis, por lo que se acumula con el tiempo en forma de cuerpos residuales.

La bilirrubina es un pigmento rojo amarillento que es liberado rápidamente de los macrófagos en la hemocatéresis o hemólisis fisiológica, por lo que normalmente no forma inclusiones de pigmento. Es eliminada por las células hepáticas de la vesícula biliar.

www.elsolucionario.org

La hemoglobina es el colorante rico en hierro de los eritrocitos que condiciona su capacidad de transportar oxígeno.

La vida media normal de los eritrocitos es de unos 120 días. Al cabo de este periodo son fagocitados por los macrófagos hepáticos, tímicos y de la médula ósea (hemocatéresis), y la hemoglobina se degrada a los pigmentos hemosiderina (ricos en hierro) y bilirrubina.

La hemosiderina (del griego *haima,* sangre, y *sideros,* hierro) es de color pardo dorado y se encuentra como gránulos citoplasmáticos en las células fagocíticas. Se puede distinguir la hemosiderina con tinciones histoquímicas para hierro. En las imágenes obtenidas por microscopia electrónica, en las zonas pigmentadas se ve gran cantidad de partículas de ferritina, la proteína rica en hierro.

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

www.elsolucionario.org

Capítulo 4

Núcleo celular. Estructura y expresión génica

Dolores Javier Sánchez González, Nayeli Isabel Trejo Bahena, Claudia Marta Martínez Martínez, Esaú Floriano Sánchez

INTRODUCCIÓN

En el pasado se creía que las células estaban formadas por una gelatina uniforme de protoplasma; ahora se sabe que las células eucariotas tienen citoplasma y núcleo. El núcleo celular es un compartimento de las células eucariotas limitado por una membrana denominada nucleolema que contiene al genoma (la información genética) en forma de cromatina. La cromatina son complejos de DNA superenrollado sobre una clase de proteínas denominadas histonas. Cuando la célula se divide, las fibras de cromatina se hacen visibles en el microscopio óptico en forma de cromosomas. Durante la interfase (entre divisiones), la cromatina se dispersa para facilitar la expresión de la información genética. En la interfase el núcleo tiene los siguientes componentes (figura 4-1):

1. **Envoltura nuclear.** El núcleo está rodeado por una membrana doble: una membrana interna y otra externa, separadas por una cisterna perinuclear y perforadas por complejos de poros nucleares. La membrana externa se continúa con la del retículo endoplasmático rugoso (RER) y contiene ribosomas adosados.

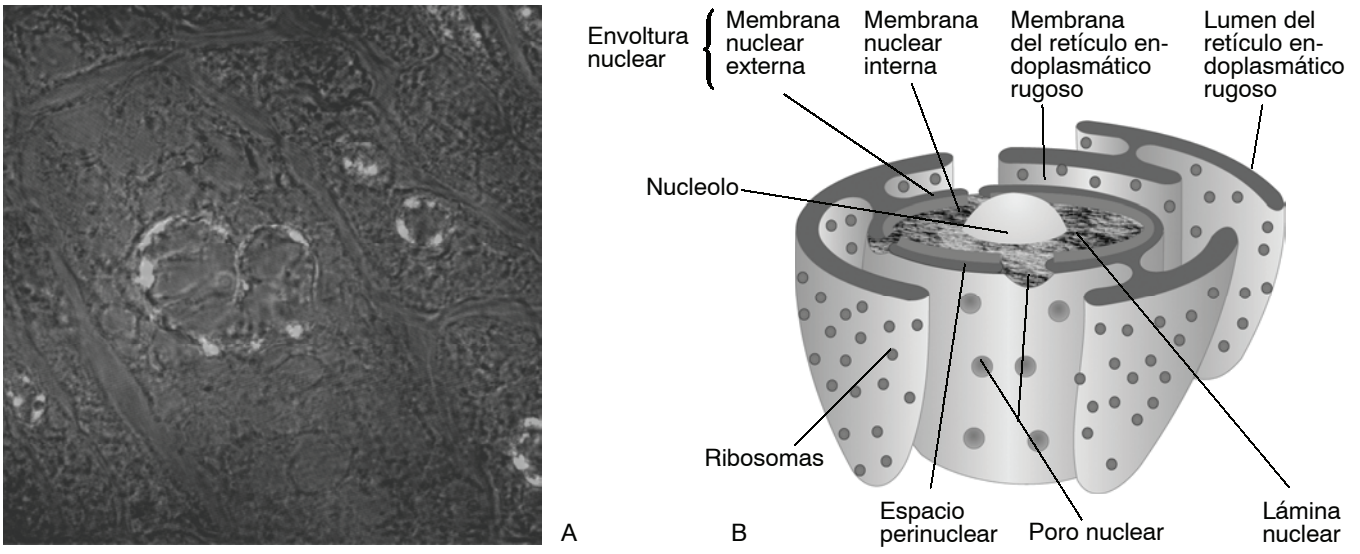


Figura 4-1. ***A.*** Fotografía de núcleos celulares (rojos) de células del eje embrionario de maíz, teñidos con yoduro de propidio, el cual tiñe DNA. Microscopia confocal con Varell a 1000 X. ***B.*** Esquema de un núcleo celular donde se muestran sus principales componentes. Envoltura nuclear, nucleoplasma o carioplasma, cromatina, nucleolo y la continuación del nucleolema con el RER.

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

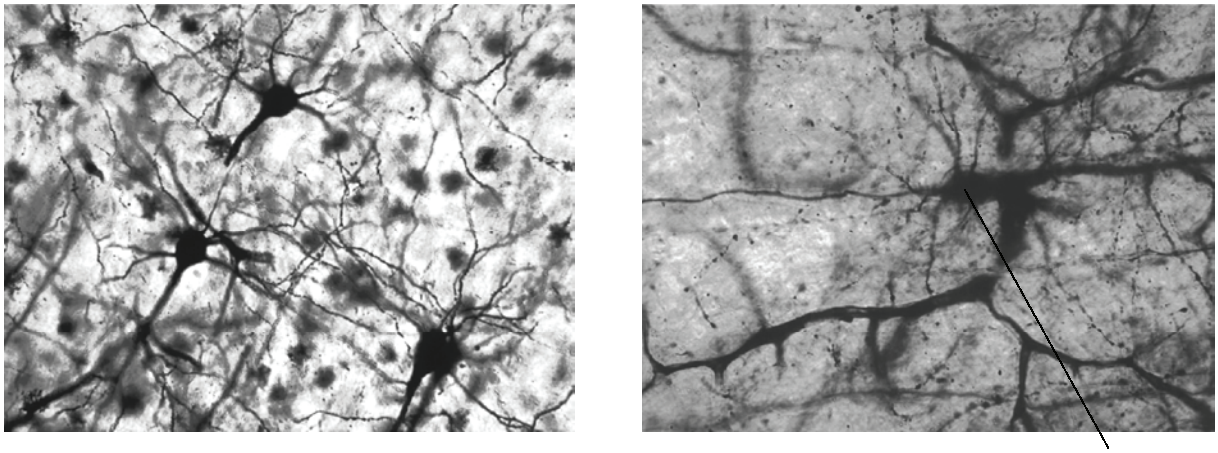


Figura 4–2. Núcleos celulares elípticos de neuronas. Las neuronas corticales tienen núcleos elípticos incluidos en el soma neuronal. ***A.*** Tinción de Golgi–Cox–Nissl. ***B.*** Tinción de Golgi rápido.

2. **Nucleoplasma o carioplasma.** El jugo nuclear es la materia fundamental que llena el núcleo y está constituido por una disolución coloidal que no es cromatina ni nucleolo.
3. **Cromatina.** Es el material nuclear organizado en eucromatina y heterocromatina, contiene DNA, histonas y proteínas nucleares.
4. **Nucleolo.** Es una pequeña región especial en la que se sintetizan partículas que contienen rRNA y proteína, las cuales migran al citoplasma a través de los poros nucleares y a continuación se modifican para transformarse en ribosomas.

La forma del núcleo es variable: puede ser redondo, oval o elíptico, como en las neuronas (figura 4–2). Su volumen es relativo (pero la relación núcleo–citoplasma es constante); ocupa una posición central en la célula (en general), pero puede estar situado cercano a la membrana nuclear, con un diámetro promedio de 5 μm. En todas las células humanas existe un núcleo, con excepción de los eritrocitos, pero también hay células binucleadas y plurinucleadas. Los núcleos presentan un doble aspecto según se hallen en reposo o en etapa de división celular. En periodo de reposo se observan en su interior nucleolos, mismos que desaparecen durante la división celular. Su composición química es compleja (proteínas, lípidos, compuestos inorgánicos, DNA, RNA, protaminas e histonas). La membrana nuclear está perforada por poros que permiten el intercambio de material celular entre nucleoplasma y citoplasma.

En el DNA nuclear se encuentra el genoma, el cual contiene la información biológica necesaria para constituir y formar nuevos organismos de la misma especie. La mayor parte de los genomas se encuentran constituidos por DNA, pero en el caso de algunos virus, por RNA. En las células eucariotas, el DNA se localiza en los cromosomas del núcleo celular y en las mitocondrias. Una de las principales funciones del genoma es almacenar la información genética, duplicarla y transmitirla de una generación a otra (replicación), permitir su expresión y sus posibles cambios propios de la evolución.

Cada ser vivo tiene un número constante de cromosomas en sus células somáticas. La cromatina se encuentra en el carioplasma en segmentos de longitud variable; se denominó así porque se colorea intensamente con colorantes básicos, como la hematoxilina. La información del genoma se encuentra codificada en secuencias de nucleótidos que forman los genes. Un gen es la unidad de transmisión hereditaria o genética que controla la síntesis de un polipéptido (proteína) o de una molécula de RNA y que ocupa un sitio determinado en los cromosomas conocido como *locus*. La información que contiene un gen es leída por proteínas que van unidas al genoma y son las encargadas de iniciar las reacciones bioquímicas que se traducen como expresión genética. El núcleo controla la síntesis de proteínas en el citoplasma enviando RNA mensajeros, los cuales son sintetizados cuando los genes se activan y abandonan el núcleo a través de los poros nucleares. En el citoplasma, los mRNA son captados por los ribosomas, los cuales traducen su código genético y sintetizan la proteína específica correspondiente. Una kilobase (kb) equivale a 1 000 bases, mientras que una megabase (mb) equivale a un millón de bases. El haplotipo es la constitución genética de un individuo con respecto a uno de los miembros de un par de genes alélicos, lo que puede constituir grupos de marcadores genéticos en los cromosomas. En el ser humano, el genoma tiene 3 300 millones de pb

www.elsolucionario.org

sólo en el DNA que forman los cromosomas. A pesar de que las mitocondrias tienen genes, estos genes no se consideran parte del genoma nuclear, sino del genoma mitocondrial. El término genotipo se refiere a un conjunto de genes constitutivos de un individuo o de una especie, generalmente referidos a uno o varios genes relevantes en un determinado contexto, mientras que el fenotipo incluye los caracteres hereditarios que posee cada individuo dentro de la especie y que le dan su apariencia física; por ello se considera una realización visible del genotipo en un ambiente determinado. En el ser humano el genoma es diploide, porque el número de cromosomas es doble en las células somáticas. La cromatina se compone de ribonucleoproteínas y se tiñe intensamente con el carmín y los colores básicos de anilina.

Actualmente se sabe que las estructuras dentro del núcleo no están situadas al azar, sino delimitadas de manera precisa por zonas denominadas territorios, las cuales incluyen complejos proteicos con funciones específicas para cada región.

ENVOLTURA NUCLEAR O NUCLEOLEMA

Está formada por dos membranas, cada una de las cuales tiene un espesor aproximado de 60 a 70 Å separadas por un espacio transparente para los electrones de 150 y 200 Å de ancho, denominado espacio cisternal perinuclear, que puede contener proteínas sintetizadas; ambas membranas son de tipo trilaminar. Su función es separar el nucleoplasma del citoplasma, regular el paso de moléculas entre ellos y englobar la cromatina. Las dos membranas están perforadas por poros nucleares que representan alrededor de 15% de la superficie de la membrana nuclear y regulan el transporte de proteínas, ribonucleoproteínas y RNA entre el núcleo y el citoplasma. La membrana nuclear externa se continúa con la membrana del RER y puede tener polirribosomas adheridos a proteínas de anclaje ribosómico en su lado citoplasmático. Se considera al RER como una derivación de la membrana nuclear externa debido a que están muy relacionados entre sí y presentan una morfología idéntica; por lo tanto, la membrana nuclear externa sería una porción especializada del RER y, por consiguiente, una estructura del citoplasma, no del núcleo. La membrana nuclear interna se fija en una rígida malla de filamentos intermedios proteicos denominada lámina nuclear, unida a su superficie interna. La lámina nuclear es una fina capa proteica electrodensa que tiene una función nucleoesquelética o de sostén. Sus principales componentes son las láminas nucleares, un cúmulo de proteínas nucleares especializadas de filamentos intermedios y proteínas asociadas. Además participa en la organización nuclear, la regulación del ciclo celular y en la diferenciación celular. Los poros se forman por la fusión de las membranas interna y externa de la envoltura nuclear. Estos poros tienen ocho subunidades proteicas de dominios múltiples dispuestas en una armazón central octogonal. En la periferia los poros forman una estructura cilíndrica denominada complejos de poros nucleares, compuesta por cerca de 50 proteínas nucleoporinas que rodean al poro central y forman un canal con diafragma que regula el paso de proteínas entre el citoplasma y el núcleo. Los complejos de poros nucleares funcionan como canales por los cuales se produce en forma regulada el intercambio de moléculas entre el nucleoplasma y el citoplasma. Las moléculas grandes dependen de una secuencia señal adherida denominada secuencia de localización nuclear (SLN), formada por cuatro a ocho aminoácidos para poder ingresar al núcleo, mientras que las moléculas hidrosolubles pequeñas menores de 4 kDa pasan por los poros mediante difusión simple. Para que las proteínas grandes ingresen al núcleo, necesitan además que otra proteína citosólica que actúa como receptor nuclear de importación se adhiera a la señal de localización nuclear en presencia de ATP para dilatar al poro. La salida de las subunidades ribosomales fabricadas en el nucleolo, así como también los tRNA, se regula por un sistema de transporte activo mediado por señales de exportación nuclear.

Cuando el núcleo se disuelve en la división celular, la membrana nuclear se desintegra en vesículas membranosas adheridas a las proteínas fosforiladas, que son fracciones de la lámina nuclear, ya que ésta se despolimeriza por fosforilación. En la telofase temprana, las proteínas se defosforilan y las vesículas se repolarizan alrededor de los cromosomas. En la telofase tardía, las vesículas se reúnen y reconstituyen la envoltura nuclear de las células hijas, que activamente importan proteínas con la SLN para reconstituir los poros nucleares (figuras 4-3 y 4-9).

POROS NUCLEARES

Tienen un diámetro variable entre 40 y 80 nm (400 y 800 Å) y se encuentran en cantidades variables en las diferentes estirpes celulares. Son muy frecuentes en células con gran actividad metabólica, en las que los intercambios entre el núcleo y el citoplasma son intensos, como

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

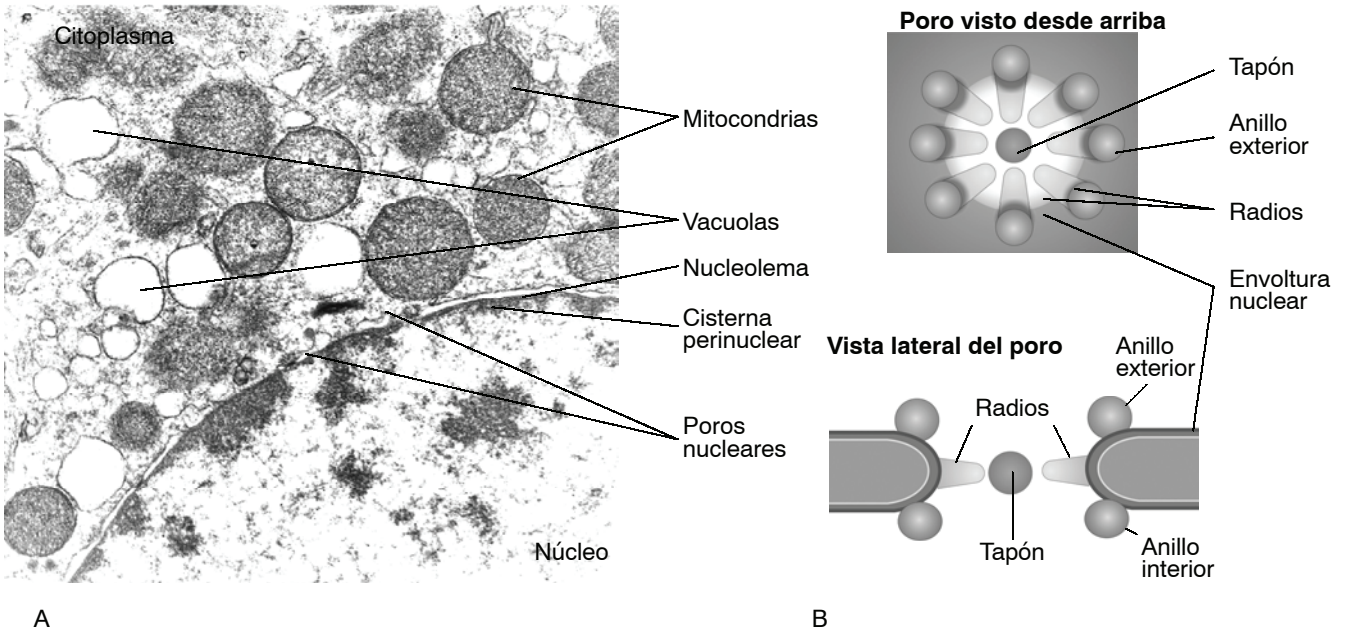


Figura 4–3. Poros nucleares. ***A.*** Fotografía de un núcleo interfásico donde se muestran el nucleolema y poros nucleares. MET. 20 000 X. ***B.*** Esquema de los poros nucleares en vista superior y lateral.

en los oocitos. Su función consiste en permitir los intercambios moleculares entre el núcleo y el citoplasma, pero sólo permiten el paso de determinadas sustancias, dependiendo de su tamaño y de su composición molecular (figura 4–4).

NUCLEOLO

El nucleolo sintetiza las dos subunidades ribosomales; al microscopio electrónico se presenta constituido por dos elementos: granular denso de 150 a 200 Å, homólogo morfológicamente a los ribosomas, y fibrilar denso. Ambas estructuras contienen RNA de elevado peso molecular asociado a RNA soluble. El componente granular representa la mayor parte de la ribonucleoproteína (RNP). Este organelo nuclear mide aproximadamente 1 μm de diámetro, es de forma ovalada y se tiñe intensamente con colorantes básicos; la basofilia está dada por la gran cantidad de ribonucleoproteínas. El nucleolo se encuentra rodeado por un anillo basófilo positivo a la tinción de Feulgen, debido a la cromatina asociada al nucleolo. Se pueden encontrar nucleolos grandes en las células que llevan a cabo una gran síntesis de proteínas,

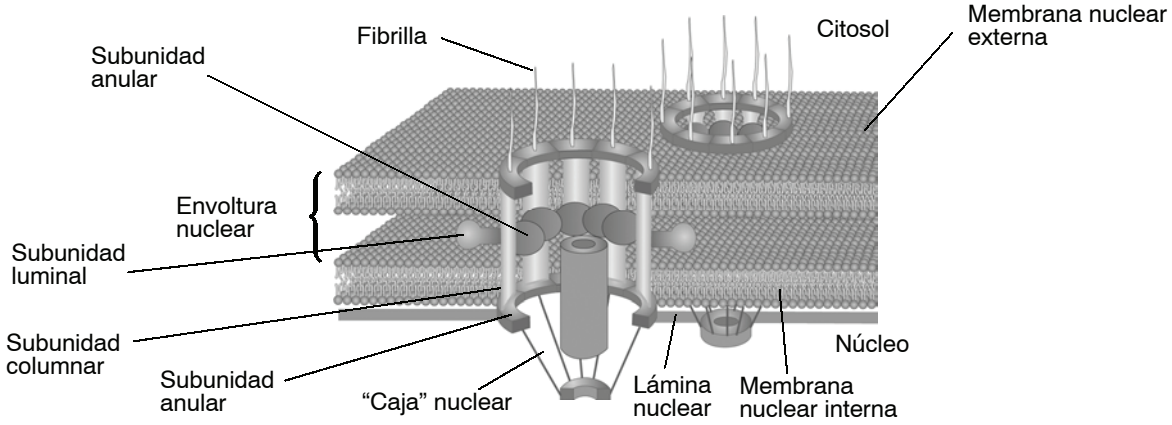


Figura 4–4. Detalle de los poros nucleares. Estos poros tienen un diámetro máximo de 120 nm y sólo miden 10 nm en el orificio central.

www.elsolucionario.org

como las células embrionarias y acinares del páncreas, pero también pueden estar ausentes en las células que no sintetizan proteínas, como los espermatozoides. El número de nucleolos también es variado (de uno a cuatro, en promedio) y esto se encuentra regulado por las regiones organizadoras de nucleolos (RON) que contienen secuencias repetidas de DNA codificadoras de rRNA. Las células con escasa síntesis proteica tienen nucleolos poco prominentes, a veces ocultos por las masas de cromatina. En los cromosomas humanos se encuentran 10 RON (figura 4-5).

El aspecto del nucleolo al microscopio electrónico es variable; en las células activas metabólicamente tiene un gran componente granular, centros fibrilares y un componente fibrilar denso, que se encuentran incluidos en la matriz nuclear (figura 4-6).

La matriz nuclear fue descrita por Zbarskii y Debov en 1948, y el término fue utilizado por primera vez por Berezny y Coffey en 1974. Esta matriz está compuesta por tres elementos: lámina nuclear, nucleolo y estructuras fibrogranulares, también conocidas como matriz interna.

El componente granular representa la ribonucleoproteína, que está formada por gránulos electrodensos de 15 nm de diámetro. Los centros fibrilares se distinguen como zonas redondeadas, electrodensas, de estructura fibrilar; el componente fibrilar denso rodea a los centros fibrilares como una capa electrodensa de material fibroso. La cromatina asociada al nucleolo rodea a éste como

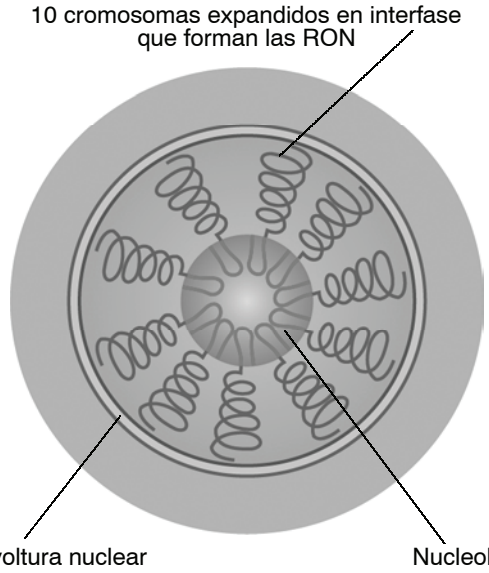


Figura 4-5. Esquema de las regiones organizadoras de nucleolos (RON) que contienen secuencias repetidas de DNA codificadoras de rRNA. En los cromosomas humanos se encuentran 10 RON.

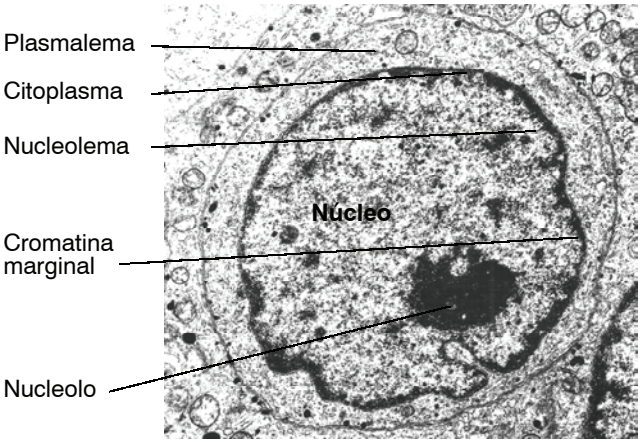


Figura 4-6. Fotografía de un núcleo interfásico donde se observa el nucleolo. El aspecto del nucleolo al microscopio electrónico es variable; en las células metabólicamente activas tienen un gran componente granular, centros fibrilares y un componente fibrilar denso, que se encuentran incluidos en la matriz nuclear. MET 15 000 X.

una cubierta de la cual parten prolongaciones que penetran hacia el interior del nucleolo y establecen contacto directo con los centros fibrilares, dado que atraviesan la capa del componente fibrilar denso. Esta cromatina asociada al nucleolo se compone de masas heterocromáticas condensadas que contienen fibras de cromatina de 30 nm. En los sitios en donde tienen contacto con los centros fibrilares se emiten los delgados filamentos extendidos de cromatina que forman la masa principal del centro fibrilar y que sufren transcripción para formar rRNA.

Se ha demostrado que el nucleolo es el sitio donde se realiza la síntesis de las dos subunidades ribosomales. En los centros fibrilares se lleva a cabo la transcripción de las moléculas de pre-rRNA, dado que contienen fibras extendidas de cromatina con actividad genética (sitio de localización de genes codificadores de rRNA). Oscar L. Miller y B. R. Beatty demostraron en 1969 la transcripción de pre-rRNA mediante microscopia electrónica, al aislar nucleolos de oocitos de anfibios en cuyo núcleo fibrilar se aislaron las hebras de DNA (figura 4-7).

La ubicación de los extremos de cromosomas que contienen las copias del rRNA dentro del nucleolo se debe a que, en esta zona del núcleo, las moléculas de RNA polimerasa y los ribonucleótidos necesarios para su formación están disponibles fácilmente. Esta zona nuclear de alta producción de rRNA se tiñe intensamente con colorantes básicos; por ello, los primeros microscopistas pensaron que el nucleolo era el núcleo del núcleo, de donde deriva su nombre.

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

Figura 4-7. Esquema de una preparación de nucleolos donde se observa la transcripción activa de rRNA como la observaron Oscar L. Miller y B. R. Beatty mediante microscopia electrónica en 1969. Después de estimular la síntesis de RNA ribosomal, el DNA de la región organizadora nucleolar (RON) activa la transcripción de rRNA en los vértices de las estructuras con forma de árbol representadas en esta figura.

La síntesis de rRNA de los centros fibrilares es catalizada por la RNA polimerasa I, que, junto con una serie de factores de transcripción, localiza y fija una secuencia promotora por encima de la secuencia codificadora del gen. Esta secuencia de DNA tiene tres genes juntos (tándem de genes) que codifican rRNA de 18S, 5.8S y 28S, los cuales se transcriben juntos en forma de una gran molécula de pre-rRNA, que durante el tratamiento posterior *(splicing)* se divide en los tres rRNA correspondientes. El transcrito prerribosómico primario rRNA 45S, de 13 000 nucleótidos, se recubre por casi 80 tipos moleculares de proteínas que provienen del citoplasma. Este primer transcrito se degrada en tres fracciones, con pérdida de algunos nucleótidos y de las proteínas asociadas: rRNA 28S, rRNA 5.8S y rRNA 18S. Esta unidad de transcripción que codifica las tres moléculas de rRNA se presenta varias veces como DNA repetido, separado de las secuencias espaciadoras del gen no transcrito que contienen el promotor, entre otras secuencias. En el ser humano existen casi 200 copias por genoma haploide de estos genes unidos, dispuestas en tándem en determinadas regiones de algunos cromosomas, separadas por regiones no codificantes. Cada gen tiene una longitud de 8 000 a 13 000 nucleótidos, dependiendo de la especie.

Durante la transcripción, la molécula de pre rRNA se asocia a proteínas ribosomales, que son sintetizadas en el citoplasma y se trasportan al núcleo, para formar moléculas de ribonucleoproteína. El componente rRNA 5S de los ribosomas es sintetizado fuera del nucleolo, proceso catalizado por la RNA polimerasa III (el gen tiene 120 nucleótidos; en seres humanos hay 2 000 copias de este gen en un único grupo); posteriormente ingresa al centro fibrilar, donde, en forma de nucleoproteína y junto con pre-RNA ribonucleoproteína, forma parte de la partícula 80S, la cual sufre el primer tratamiento en el componente fibrilar denso y continúa como partícula de ribonucleoproteína hacia el componente granular, donde tiene lugar el tratamiento posterior y la maduración, con transformación a subunidades ribosomales terminadas. Los rRNA 28S, 5.8S y 5S forman la subunidad ribosómica mayor (60S), mientras que el rRNA 18S integra la subunidad ribosómica menor (40S) (figura 4-8).

Ambas subunidades se exportan por separado del nucleolo hacia el citoplasma. Las RON de los cinco pares de cromosomas humanos (13, 14, 15, 21 y 22) que contienen los genes de RNA ribosomales forman bucles dentro del nucleolo, donde se activa la transcripción por la RNA polimerasa I. La unión de las subunidades de ribosomas en torno al mRNA ocurre en el citoplasma al iniciar la traducción. El nucleolo y el nucleolema se dispersan durante la división celular y vuelven a formarse en las células hijas cuando los núcleos se reconstituyen (figura 4-9).

CROMATINA

Es un conglomerado de DNA y proteínas responsable de la basofilia característica del núcleo. Como se ve en la figura 4-10, se clasifica en:

1. Cromatina marginal (perímetro del núcleo).
2. Cariosomas (se encuentran por todo el núcleo).
3. Cromatina asociada con el nucleolo (se encuentra en relación con el nucleolo).
4. Eucromatina (cromatina genéticamente activa). Se observa clara al microscopio electrónico.
5. Heterocromatina (cromatina genéticamente inactiva). Se observa obscura al microscopio electrónico.

La eucromatina o cromatina dispersa es genéticamente activa, ya que se puede transcribir; es abundante en las

www.elsolucionario.org

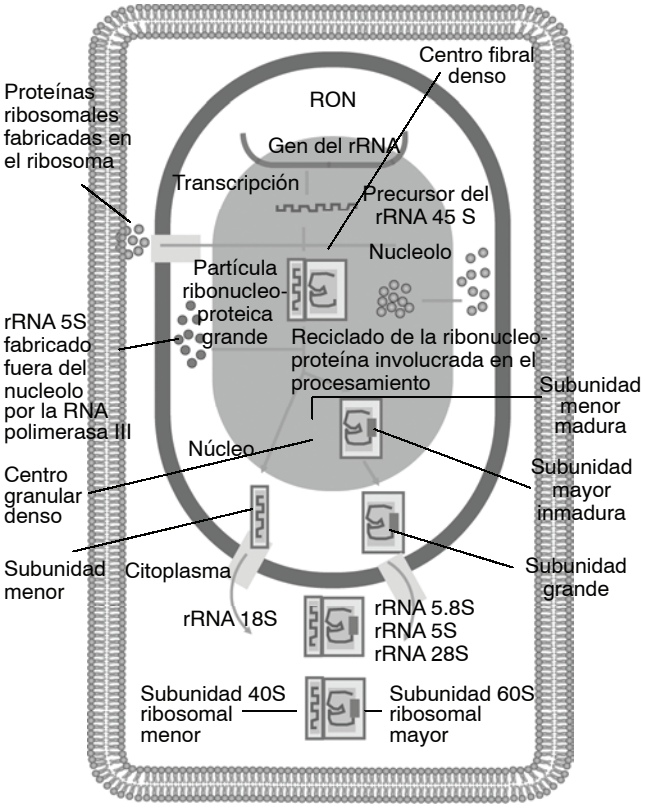


Figura 4–8. Esquema de la síntesis ribosomal en el nucleolo. Los rRNA 28S, 5.8S y 5S forman la subunidad ribosómica mayor (60S), mientras que el rRNA 18S integra la subunidad ribosómica menor (40S). Ambas subunidades se exportan por separado del nucleolo hacia el citoplasma. Los rRNA se sintetizan en el nucleolo por la RNA polimerasa I, excepto el componente rRNA 5S, que se sintetiza fuera del nucleolo por la RNA polimerasa III.

células que sintetizan muchas proteínas, como neuronas y hepatocitos.

La ausencia de color en estas zonas se debe a su dispersión, pero al condensarse se forman cúmulos teñidos intensamente. La heterocromatina o cromatina condensada predomina en las células genética y metabólicamente inactivas, como los linfocitos pequeños circulantes y los espermatozoides.

Las zonas nucleares no ocupadas por cromatina ni por el nucleolo se denominan región intercromatiniana, y dentro de ella se ubican los cuerpos espiralados, formados por fibras de 40 a 60 nm. La región pericromatiniana es una franja de 10 a 150 nm de ancho que rodea la heterocromatina.

Ciertas secuencias repetidas de DNA regulan su expresión por inactivación, ya que se encuentran en la llamada heterocromatina constitutiva, que contiene DNA permanentemente inactivado. La heterocromatina facultativa contiene genes inactivos durante el desarrollo normal de determinados tipos celulares. Entre las proteínas de cromatina existen cinco proteínas básicas, denominadas histonas.

Las unidades cromatínicas más pequeñas son complejos macromoleculares de DNA e histonas denominados nucleosomas (unidades fundamentales de empaquetamiento del DNA), los cuales se encuentran en todas las formas de cromatina, así como en los cromosomas. Miden 10 nm de diámetro y se componen de un centro de ocho moléculas de histonas en forma de cuentas de rosario unidas por DNA.

Una larga cadena de ellos se enrolla para formar una fibrilla cromatínica que, al ser menos compacta en la eucromatina, permite que las DNA polimerasas entren en contacto con el DNA.

La cromatina periférica o marginal se define como cúmulos densos de tamaño variable en contacto con el nucleolema, y la cromatina asociada con el nucleolo forma un anillo en torno a él y envía prolongaciones hacia su interior.

En la cromatina hay dos tipos de proteínas: las histonas, que representan la mayor parte de las proteínas de la cromatina y son las principales responsables del empaquetamiento del DNA, y las no histonas, como las polimerasas de DNA y RNA y proteínas reguladoras de genes, entre otras.

Los cromosomas contienen una única molécula de DNA que en el cromosoma humano más grande, el número 1, contiene casi 2.5×10^8 pb. Además de su conformación estructural, la cromatina también está organizada en cuatro dominios funcionales asociados a la estructura.

Estos cuatro dominios son los siguientes:

1. **Sitios de hipersensibilidad a DNasa I.** Zonas del DNA donde la conformación de la cromatina permite el acceso de la acción endonucleasa de la DNasa I.
2. **Elementos tipo LCR *(locus control region)*.** Elementos de regulación integrados por un sitio o grupo de sitios de hipersensibilidad a DNasa I que tienen la función de regular la expresión de un gen o un grupo de ellos.
3. **Secuencias tipo MAR/SAR.** Los términos MAR/SAR son sinónimos y se refieren a la frase en inglés: *matrix attachment regions* o *scaffold associated regions*. Son secuencias del DNA con capacidad de unión a la matriz nuclear.
4. **Delimitadores *(insulators)*.** Son las zonas de cromatina que facilitan la formación y mantenimiento de dominios con actividad transcripcional activa, lo que garantiza una expresión del gen prolongada sin interrupciones.

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

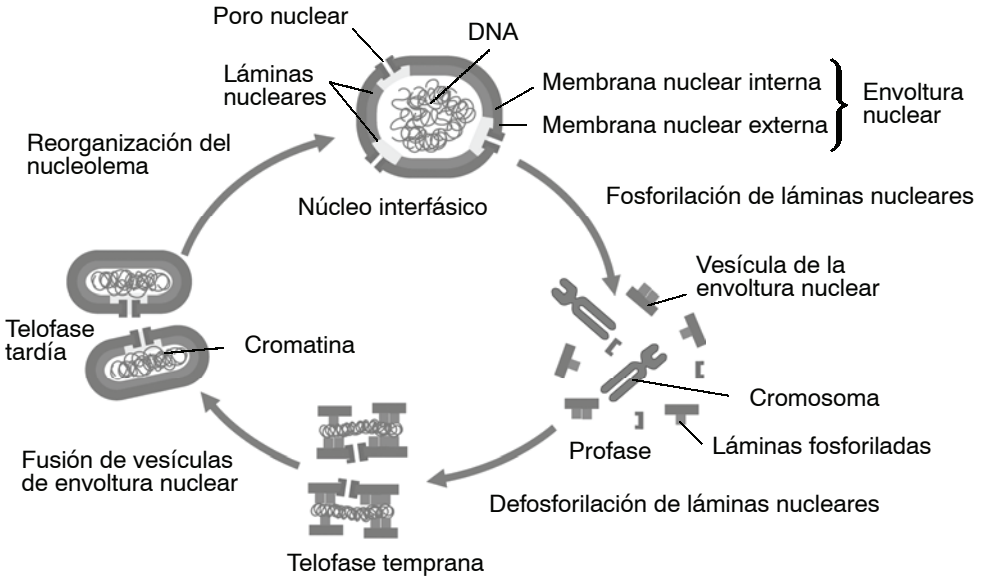


Figura 4–9. Representación de la desaparición del nucleolema durante la división celular. Este proceso se inicia cuando las láminas nucleares se fosforilan, y se revierte cuando se defosforilan.

EMPAQUETAMIENTO DEL DNA

En la célula, el DNA está dispuesto como un conjunto de paquetes organizados denominados cromátides; dos cromátides idénticas constituyen un cromosoma, el cual es visible durante la división celular. A su vez, los núcleos contienen dos juegos de cromosomas, ya que las células somáticas del humano son diploides. Uno de los juegos de cromosomas proviene del padre y el otro proviene de la madre (de modo que la información genética contenida es diferente entre sí). Los cromosomas de un solo juego se llaman homólogos del otro juego. Cada cromosoma se distingue por su tamaño, sus características de forma y su patrón de bandas. El conjunto de cromosomas conforma el cariotipo, es decir, el paquete cromosómico de un individuo. La cromatina, además de contener DNA, contiene proteínas (histonas y no histonas) que están unidas al DNA para formar desoxirribonucleoproteínas. Por lo tanto, la cromatina es un complejo de DNA y proteínas que presenta los cromosomas relajados, desenrollados en la interfase del núcleo. La heterocromatina es la forma inactiva condensada de la cromatina (se tiñe con tinción de Feulgen) que la hace visible al microscopio de luz; la eucromatina es la forma activa de la cromatina en la que se transcribe al RNA el material genético del DNA. Si los núcleos celulares son expuestos a una solución hipotónica, explotan y se pueden fijar y teñir para observar con el microscopio la cromatina como un reticulado de fibras de 30 nm en forma de collar de perlas. Este cordón está constituido por nucleosomas formados de histoproteínas rodeadas por un DNA de 10 nm dispuestos en hilera e interconectados por un filamento delgado de DNA de 2 nm de diámetro. Las histonas se forman de polipéptidos cortos cargados positivamente (básicos), que son atraídos por las cargas negativas del DNA (ácido).

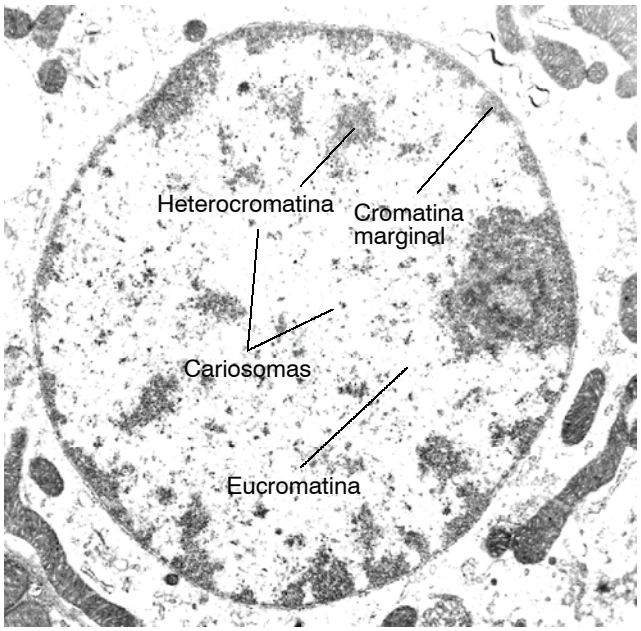


Figura 4–10. Fotografía de un núcleo con abundante eucromatina. Se observan los cariosomas, la heterocromatina dispersa y la cromatina marginal. MET 15 000 X.

www.elsolucionario.org

Debido a que las histonas son proteínas básicas ricas en lisina y arginina, se pueden unir a los ácidos fosfóricos independientemente de la secuencia nucleotídica, forman la mayor parte proteica de la cromatina y son las principales responsables del empaquetamiento del DNA. El DNA de un cromosoma tiene un grado de compactación de 5 000 a 10 000 veces respecto a la longitud del cromosoma; un cromosoma humano tiene una longitud de 5 nm y posee en cada cromátide un filamento de DNA de 50 000 nm, que es igual a 5 cm de largo. Dentro del cromosoma, el DNA se encuentra compactado en varios órdenes sucesivos de empaquetamiento. Las histonas se sintetizan durante la fase S del ciclo celular y su función principal es el empaquetamiento del DNA.

Los casi 2 m de DNA dentro de los núcleos celulares humanos se empaquetan en 46 cromosomas de 200 nm de largo en promedio. Se calcula que existen 90 millones de moléculas de histonas por célula, la mayoría de las cuales son tipo 1 (H_1). Los cinco tipos de histonas son los siguientes: H_1, H_{2A}, H_{2B}, H_3 y H_4, y con excepción de la H_1, el resto de las histonas son muy similares entre las células eucariotas y forman los nucleosomas (no existen en las células procariotas). El empaquetamiento del DNA puede describirse en tres niveles (figura 4-11):

Nucleosomas

El primer nivel de organización del DNA se logra con la formación del nucleosoma, en donde el DNA se envuelve alrededor de complejos proteicos que reciben el nombre de partículas centrales del nucleosoma.

Se forman de unidades repetitivas de histonas integradas en un octámero (H_{2A}, H_{2B}, H_3 y H_4, dos de cada una), como esferas aplanadas de 10 nm, alrededor del cual se enreda una hebra de DNA de 140 pares de bases (pb) remachada por fuera con la H_1, después de la cual se extiende una fibra de 60 pb de DNA que forma un puente internucleosomal que une el siguiente nucleosoma. Mediante digestión con ácidos débiles se desprende la H_1, que deja los nucleosomas aislados como cuentas de rosario.

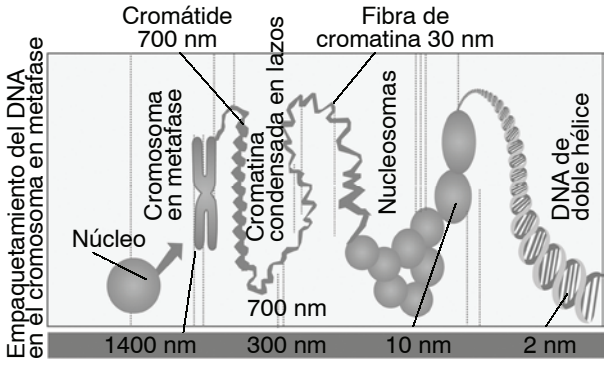


Figura 4-11. El DNA o ácido desoxirribonucleico es una molécula formada por cadenas de nucleótidos formados por cuatro diferentes bases nitrogenadas abreviadas A, T, G y C. El DNA de la cromatina nuclear se enrolla en un complejo de histonas formando nucleosomas, los cuales a su vez se repliegan sobre sí mismos para formar fibras de cromatina, y éstas forman los cromosomas altamente empaquetados. En todo este proceso se producen 10 000 plegamientos del DNA.

Histonas

Son proteínas cargadas positivamente y, por lo tanto, pueden formar enlaces iónicos con los grupos fosfatos negativos en los ácidos nucleicos. Para el ensamblaje es necesaria la presencia de dos moléculas: la nucleoplasmina, proteína ácida que permite que las histonas y el DNA se junten en forma controlada, y la DNA topoisomerasa I, enzima que ayuda al DNA a la formación de la superhélice. La DNA topoisomerasa I corta una de las dos hebras del DNA para desenrollarlo y no requiere energía, mientras que la DNA topoisomerasa II corta las dos hebras, requiere ATP y puede cambiar de posición las hebras, por lo que también se denomina girasa.

Las histonas nucleosomales son H_{2A}, H_{2B}, H_3 y H_4, que tienen de 102 a 135 aminoácidos, y las no nucleosomales del tipo 1 (H_1), que son más grandes, con 223 aminoácidos (figura 4-12).

Las histonas nucleosomales integran un núcleo solenoide constituido por dos capas cilíndricas superpuestas, compuestas de ocho subunidades de histonas (dos moléculas de H_{2A}, H_{2B}, H_3 y H_4), en el que se enrolla la molécula de DNA como un yo-yo al que da dos vueltas para formar un nucleosoma. La H_1 queda fuera del solenoide. Las histonas H_1 se unen al DNA mientras se va enrollando alrededor de la partícula central, y también a otras histonas H_1 para permitir que el DNA alcance su segundo nivel de organización. Este nivel de empaquetamiento se conoce como collar de perlas por su forma, ya que cada nucleosoma está separado por una sección de DNA no enrollado. La fibra de cromatina es el siguiente nivel de empaquetamiento del DNA, donde los nucleosomas se acomodan formando una especie de hélice (cada vuelta de la hélice está compuesta por seis nucleosomas), proceso en el que también interviene la histona no nucleosómica H_1. Esta fibra solenoide de 30 nm con el DNA densamente empaquetado es la que le da aspecto granulado al verse al microscopio electrónico.

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

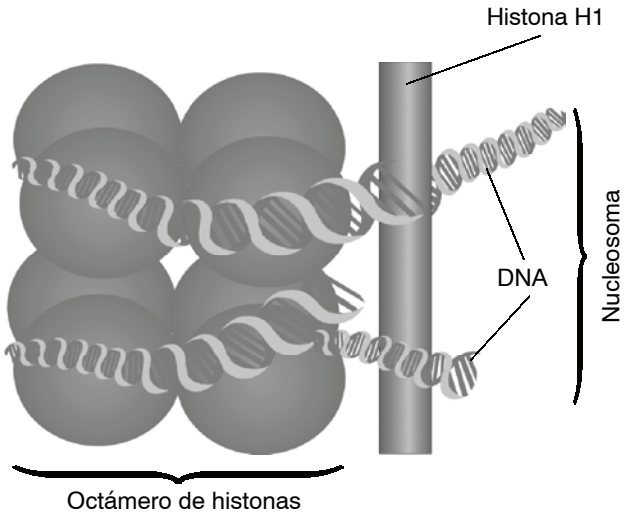


Figura 4-12. Esquema del octámero de histonas que forman un nucleosoma. Las histonas del octámero son H_{2A}, H_{2B}, H_3 y H_4, dos de cada una. Alrededor del nucleosoma se enreda una hebra de DNA de 140 pb remachada por fuera con la histona H_1, después de la cual se extiende una fibra de 60 pb de DNA que forma un puente internucleosomal que une el siguiente nucleosoma.

Posteriormente, las fibras se condensan en bucles de 300 nm y finalmente en cromátides de 700 nm de ancho. Los cromosomas tienen un ancho de casi 1 400 nm en metafase, habiendo condensado al DNA 10 000 veces sobre sí mismo (figura 4-11).

En el núcleo de los espermatozoides, las histonas se sustituyen por protaminas, que compactan más al DNA debido a que forman arreglos lineales ondulantes en vez de solenoides.

CROMOSOMAS

Su nombre deriva del griego (*chroma* = color; *soma* = cuerpo), y son estructuras del núcleo celular eucariota que consisten en moléculas de DNA y proteínas (principalmente histonas). Adquieren forma de bastoncillos que se visualizan cuando la cromatina se condensa. Los cromosomas procariotas consisten en una hebra de DNA circular libre (no asociada a proteínas).

Su número es constante en las células somáticas humanas y está repetido (diploide), mientras que en las células germinales sólo se encuentran en número sencillo (haploide). Durante la fecundación, el espermatozoide y el óvulo se unen y reconstruyen en el cigoto el número diploide de cromosomas, la mitad de los cuales proviene de cada progenitor. En las células humanas existen dos tipos de cromosomas: los autosomas, que transmiten las características, y los heterocromosomas o cromosomas sexuales, que forman el par 23 y determinan el sexo. Los hombres tienen 22 pares de autosomas y un par de heterocromosomas formados por uno X y otro Y, mientras que la mujer sólo difiere en que sus cromosomas sexuales se forman por los cromosomas XX.

Los cromosomas se agrupan por pares homólogos, que se clasifican de acuerdo con dos criterios fundamentales (figura 4-13):

1. Según la posición del centrómero, son:
   a. **Metacéntricos.** Sus brazos son de igual longitud.
   b. **Submetacéntricos.** Sus extremos son de diferente longitud y se dividen en segmentos o brazos mayores y menores.
   c. **Acrocéntricos.** Son los únicos que poseen extensiones de cromatina denominada satélite, y uno de sus brazos es muy corto.
   d. **Telocéntricos.** Tienen el centrómero en un extremo.
2. De acuerdo con su posición en el genoma, los cromosomas forman siete grupos más un par de cromosomas sexuales (figura 4-14):
   - Grupo A: 1, 2, 3.
   - Grupo B: 4, 5.
   - Grupo C: 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12.
   - Grupo D: 13, 14, 15.
   - Grupo E: 16, 17, 18.
   - Grupo F: 19, 20.
   - Grupo G: 21, 22.
   - Un par sexual, XX o XY.

Los cromosomas replicados consisten en dos moléculas de DNA asociadas a histonas que se denominan cromátides. La zona donde ambas cromátides se unen se llama

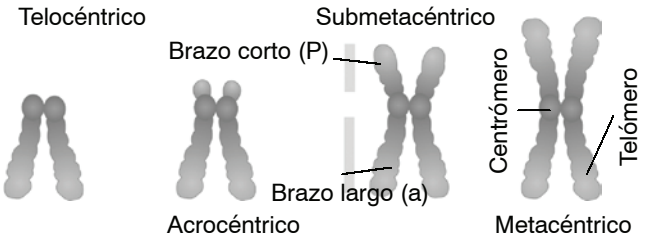


Figura 4-13. Esquema de la clasificación cromosómica según la posición del centrómero. Los metacéntricos tienen brazos de igual longitud, los submetacéntricos tienen extremos de diferente longitud y se dividen en segmentos o brazos mayores y menores, los acrocéntricos poseen extensiones de cromatina satélite y uno de sus brazos es muy corto, los telocéntricos tienen el centrómero en un extremo (telómero).

www.elsolucionario.org

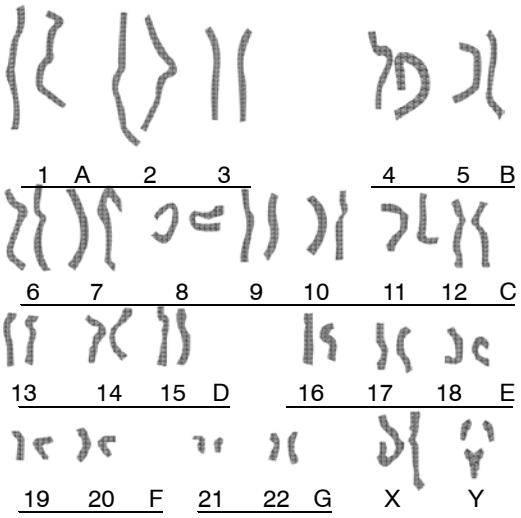


Figura 4-14. Esquema de un cariotipo humano masculino. De acuerdo con su posición en el genoma, los cromosomas forman siete grupos más un par de cromosomas sexuales: En el grupo A se encuentran los pares 1, 2 y 3; en el grupo B, los pares 4 y 5; en el grupo C, los pares 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12; en el grupo D, los pares 13, 14 y 15; en el grupo E, los pares 16, 17 y 18; en el grupo F, los pares 19 y 20; en el grupo G, los pares 21 y 22. El par sexual puede ser XX o XY.

centrómero; el cinetocoro se encuentra por fuera de éste. En los extremos del cromosoma, o telómeros, se encuentran secuencias repetidas de DNA (figura 4-15).

Los cromosomas contienen el DNA que forma los genes, los cuales determinan las características hereditarias de la célula u organismo. En las plantas y animales superiores los cromosomas se presentan por pares. El estudio de los cromosomas mediante cariotipo permite detectar alteraciones genéticas con gran precisión. En

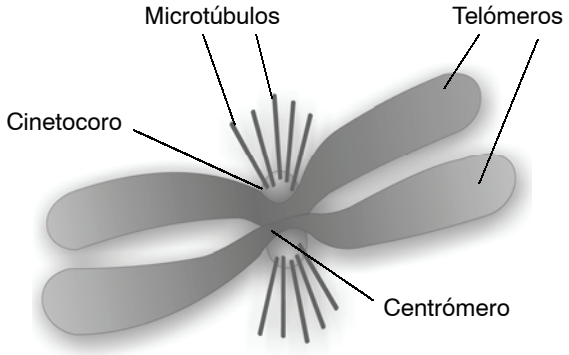


Figura 4-15. Esquema de un cromosoma en metafase. Se forma por dos cromátides idénticas en sentido longitudinal que contienen un nucleofilamento de DNA idéntico. Se unen a través del centrómero. También se observa el cinetocoro o centro organizador de microtúbulos que se forma en la mitosis para fijar los cromosomas al huso mitótico.

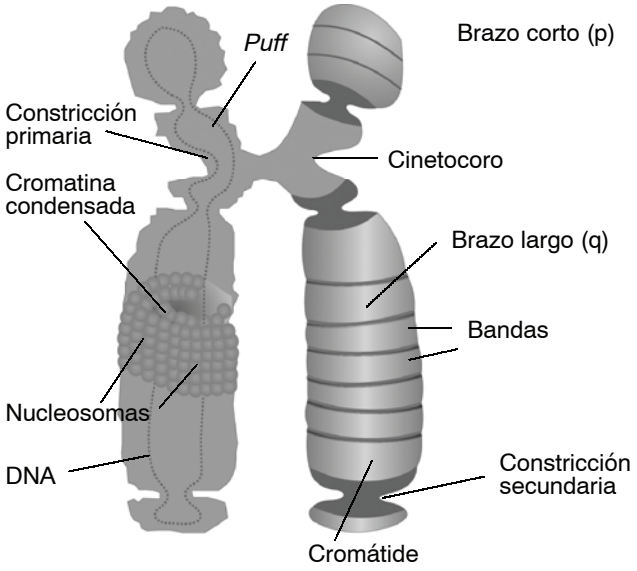


Figura 4-16. Esquema de las bandas en un cromosoma. Los cromosomas tienen regiones de heterocromatina que se visualizan en forma de bandas compactas, mientras que la eucromatina se observa como zonas claras en los cromosomas, denominadas interbandas.

1959 se descubrió el síndrome de Down o trisomía 21 (tres cromosomas 21). En las células poliploides que surgen porque las células hijas no se separan después de la mitosis, los cromosomas homólogos se aparean y forman cromosomas gigantes, denominados politénicos, que quiere decir "muchos hilos". Se han detectado más de 70 síndromes genéticos atribuibles a aberraciones cromosómicas.

Bandas cromosómicas

Los cromosomas tienen regiones de heterocromatina que se visualizan en forma de bandas compactas, mientras que la eucromatina se observa como zonas claras en los cromosomas, denominadas interbandas. Cuando los genes se expresan dentro de las bandas, la cromatina se extiende y genera una zona de mayor diámetro que el cromosoma, denominada *puff* (figura 4-16). También es posible observar grandes anillos claros que circundan a los cromosomas y que se denominan anillos de Balbiani, los cuales son sitios de transcripción activa. En la actualidad existen métodos de tinción de bandas para observación microscópica de cromosomas. Con la tinción fluorescente de quinacrina se detectan las bandas Q en microscopia de fluorescencia, mientras que con la tinción de Giemsa se detectan las bandas G observables al microscopio de luz compuesto. Con estos métodos de tinción se pueden detectar deleciones grandes de 4 000

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

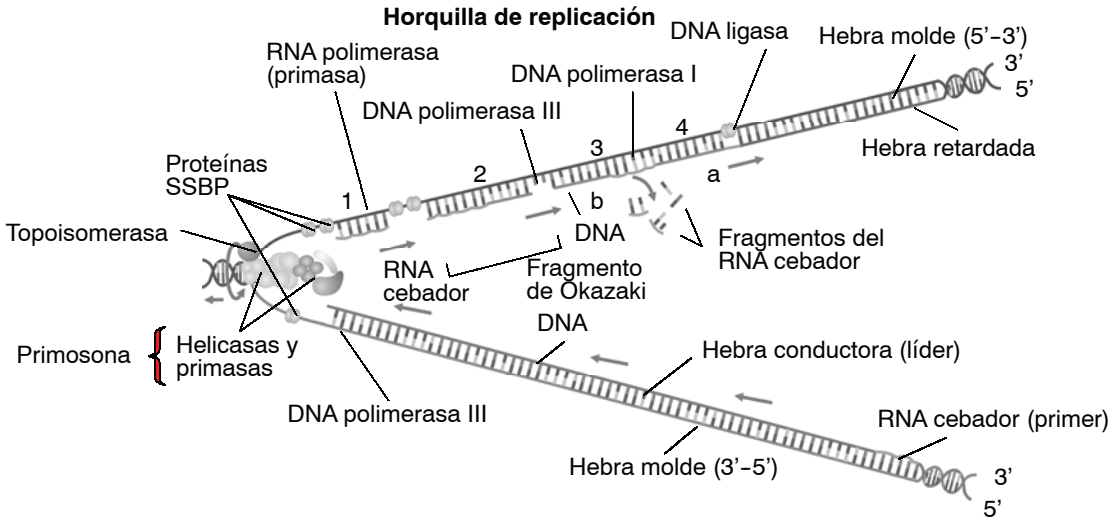


Figura 4–17. Replicación del DNA. La síntesis de DNA transcurre siempre en dirección 5' a 3' y es semidiscontinua. Se muestra la replicación de la hebra conductora y de la hebra retrasada con sus fragmentos de Okazaki. Las proteínas SSBP (*single-stranded DNA binding protein*) se unen a las hebras molde para evitar que vuelvan a enrollarse durante la replicación.

kb como mínimo; para detectar alteraciones en regiones cortas del DNA se realiza la técnica de FISH-DNA (hibridación *in situ* fluorescente para DNA).

Territorios

Durante la interfase, los cromosomas se localizan en regiones nucleares denominadas territorios cromosomales, los cuales están separados por dominios intercromosomales en forma de canales. Los genes de los cromosomas están orientados hacia estos dominios.

REPLICACIÓN (DUPLICACIÓN) DEL DNA

Es el mecanismo mediante el cual el DNA hace copias o réplicas de sí mismo. Estas moléculas se replican de manera semiconservativa al separarse la doble hélice, y cada una de las cadenas sirve de molde para la síntesis de una nueva cadena complementaria, obteniéndose como resultado final dos moléculas idénticas a la original. Sólo ocurre una vez en cada generación celular durante la fase S (de síntesis) del ciclo celular. En la mayoría de las células somáticas, la replicación del DNA ocasiona la mitosis, pero en las células germinales (espermatocitos y oocitos primarios) conduce a la meiosis. La replicación comienza en un punto de origen y normalmente es bidireccional. En levaduras se han identificado los orígenes de replicación denominados ARS *(autonomous replicating sequences)* de hasta 300 pb, que contienen secuencias conservadas esenciales para el inicio de la replicación. En los cromosomas humanos se desenrollan las hebras de DNA para formar puntos dinámicos denominados horquillas de replicación. Los lazos de replicación siempre se originan en puntos específicos denominados orígenes de replicación. A diferencia de la replicación procariota, en las células eucariotas se producen múltiples orígenes de replicación (figura 4–17).

Las hebras nuevas de DNA siempre se sintetizan en la dirección 5' a 3'. Debido a que las dos cadenas de DNA son antiparalelas (una hebra tiene dirección 5' a 3' y la otra 3' a 5'), la DNA polimerasa sólo puede leer la cadena que actúa de molde desde el extremo 3' a 5', pero no la otra hebra. La respuesta a esta incógnita de la replicación unidireccional de la hebra 5' a 3' la dio en 1968 Reiji Okazaki al encontrar que durante la replicación se sintetizan piezas cortas, denominadas fragmentos de Okazaki. Así pues, una cadena se sintetiza continuamente y la otra discontinuamente. La cadena continua o conductora es la que tiene la síntesis en dirección 5'a 3' y transcurre en la misma dirección que el movimiento de la horquilla de replicación, mientras que la cadena discontinua o retrasada es aquélla en la que la síntesis transcurre en dirección opuesta al movimiento de la horquilla. Los fragmentos de Okazaki miden entre unos pocos centenares y unos pocos millares de nucleótidos, según el tipo de célula.

Como la síntesis es bidireccional, la síntesis de una hebra es continua hacia un lado y discontinua hacia el otro. La reacción de polimerización es conducida por una ca-

www.elsolucionario.org

dena molde, de manera que donde hay una T se añade una A y donde hay una C se añade una G, y viceversa. También requiere un oligonucleótido cebador (*primer,* en inglés), el cual es un segmento de cadena nueva complementario al molde con un grupo 3'-hidroxilo libre al que se pueden incorporar más nucleótidos. El extremo 3' del cebador se conoce como extremo cebador. La DNA polimerasa sólo puede añadir nucleótidos a una cadena preexistente sin distinguir si se trata de ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos. Ninguna DNA polimerasa puede iniciar la síntesis de una cadena nueva, a diferencia de las RNA polimerasas, que sí tienen la capacidad de iniciar la síntesis *de novo*, por lo que los cebadores empleados son a menudo oligonucleótidos de RNA, que posteriormente se reemplazan por sus equivalentes de DNA.

La velocidad de la horquilla de replicación en los eucariotas es sólo una décima parte de la observada en procariotas; si sólo existiera un origen de replicación, la replicación de un solo cromosoma humano tardaría unas 500 h (21 días). Sin embargo, la replicación en cromosomas humanos ocurre en forma bidireccional a partir de múltiples orígenes de replicación separados por unos 30 000 a 300 000 pb uno de otro. En total, existen cerca de 10 000 orígenes de replicación en el genoma humano, también llamados replicones.

Replicón

Cada replicón tiene los elementos necesarios para llevar a cabo la replicación, con un origen y un final, y sólo se activan una vez en cada ciclo celular.

Replisoma

La replicación del DNA requiere la acción coordinada de varias enzimas. Se han establecido varias etapas en la replicación del DNA: reconocimiento del punto de iniciación; desenrollamiento de la doble hélice de DNA; formación de cebadores de RNA; formación de la hebra hija de DNA sobre los cebadores con eliminación posterior de los mismos, y finalmente unión de los fragmentos abiertos de DNA que quedan al final de la replicación. El complejo completo de replicación se denomina sistema DNA replicasa o replisoma. Para tener libre acceso a las cadenas de DNA, éstas deben separarse, lo cual se realiza mediante la acción de helicasas dependientes de ATP. La separación de las cadenas crea una tensión en la hélice que se resuelve por la acción de las topoisomerasas. Las cadenas separadas se estabilizan por acción de las proteínas fijadoras de DNA. Los cebadores suelen ser fragmentos cortos de RNA formados por las enzimas primasas. Cuando estos cebadores se eliminan, son reemplazados por DNA por acción de la DNA polimerasa I, aunque después de este reemplazo quedan enlaces fosfodiéster rotos en el DNA, mismos que se reparan por enzimas selladoras denominadas DNA ligasas. Se han propuesto tres modelos de replicación: dispersora, conservadora y semiconservadora.

Replicación dispersora

Las cadenas de DNA progenitoras se rompen a ciertos intervalos, y las dos moléculas hijas de DNA de doble cadena resultantes presentan fragmentos del DNA progenitor combinados con nuevos fragmentos.

Replicación conservadora del DNA

En este mecanismo, cada una de las hebras del DNA progenitor se duplica, produciendo dos moléculas de DNA hijas, una de las cuales es la molécula de DNA progenitora intacta y la otra una molécula de DNA cuyas dos hebras son nuevas.

Replicación semiconservadora

El DNA progenitor separa sus cadenas complementarias y cada una de ellas se replica sirviendo como molde para la síntesis de una cadena nueva complementaria. Cada hebra hija tiene una de las cadenas del DNA progenitor y la otra nueva, que ha sido sintetizada utilizando como molde la del progenitor. Este tipo de replicación la propusieron Watson y Crick en su modelo.

DNA polimerasas

La replicación del DNA está a cargo de las enzimas DNA-polimerasas, de las cuales se han aislado tres enzimas con propiedades catalíticas similares, la DNA-polimerasa I, II y III; parece ser que la DNA-polimerasa III es la principal enzima implicada en el proceso de replicación, mientras que la DNA-polimerasa I, además de participar también en este proceso, desempeña la función de reparación del DNA nuclear en eucariotas. Esta enzima cataliza la adición de desoxirribonucleótidos al extremo 3'-hidroxilo libre de una hebra de DNA a partir de una mezcla de nucleótidos dATP, dGTP, dCTP y dTTP. Para llevar a cabo la reacción de polimerización se requiere Mg^{2+}, además del cebador de RNA preexistente. La dirección de la síntesis de DNA es,

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

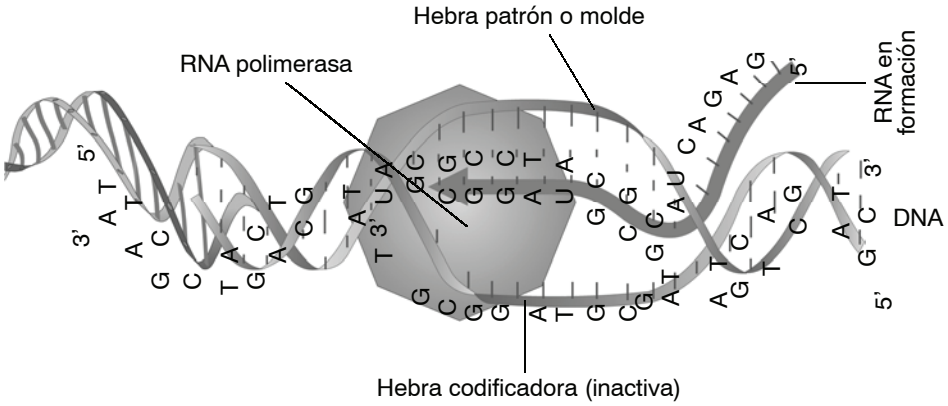


Figura 4-18. Esquema de la transcripción del DNA en RNA. Este proceso es catalizado por las enzimas RNA polimerasas, que trabajan en dirección 5' a 3'. La transcripción comienza cuando la RNA polimerasa se une al promotor por medio de los factores de transcripción y transcribe la hebra patrón (el RNA es idéntico a la hebra codificadora 5' a 3'). La secuencia de nucleótidos para la RNA polimerasa II es la caja TATA (TATAAA), 30 bases antes del sitio de inicio. El DNA sólo se abre de 15 a 20 pb.

como ya se dijo, de 5' a 3'; la reacción ocurre mediante el ataque del grupo 3'-hidroxilo (3'-OH) del desoxirribonucleótido terminal del extremo de la cadena de DNA en crecimiento, sobre el átomo de fósforo del nucleósido 5'-trifosfato que llega, desplazando a su grupo pirofosfato, el cual es escindido liberándose energía, que se utiliza en la formación de un enlace fosfodiéster, de manera que el nucleósido queda integrado a la cadena de DNA. La energía requerida para formar el nuevo enlace fosfodiéster es proporcionada por la escisión del pirofosfato del desoxirribonucleótido trifosfato (dNTP), pero en condiciones intracelulares normales la reacción de la DNA-polimerasa se completa porque el pirofosfato liberado puede hidrolizarse a ortofosfato por acción de la pirofosfatasa inorgánica.

TRANSCRIPCIÓN DE GENES

La síntesis de RNA dependiente de DNA se denomina transcripción. Como se mencionó antes, el gen está formado por moléculas de DNA que codifican RNA funcional. La secuencia del RNA es idéntica a la hebra codificante de DNA y complementaria a la hebra molde que sirve de base para la transcripción. Ésta genera tres principales moléculas de RNA necesario para síntesis de proteínas: RNA mensajero, RNA ribosomal y RNA de transferencia (mRNA, rRNA y tRNA, respectivamente). Esta molécula de RNA puede a su vez codificar para la síntesis de un polipéptido determinado. La transcripción (se produce una copia de RNA) y la traducción (síntesis de una cadena polipeptídica por la secuencia de nucleótidos del RNA transcrito) son etapas del proceso de expresión genética (figura 4-18).

En las células eucariotas, la transcripción de genes es catalizada por enzimas denominadas RNA polimerasas. Existen tres RNA polimerasas: la RNA polimerasa I, que cataliza la transcripción de rRNA (localizada en el nucleolo); la RNA polimerasa II, que transcribe mRNA y algunos pocos RNA pequeños (localizada en la cromatina), y la RNA polimerasa III, que transcribe tRNA, rRNA (5S) y algunos RNA pequeños (localizados en la cromatina) (cuadro 4-1).

El proceso de transcripción comienza cuando la RNA polimerasa se une a la secuencia de DNA denominada promotor, localizada cerca de la región que va a ser transcrita; como consecuencia, las dos hebras de la espiral doble cadena de DNA se separan frente al promotor, localizado cerca de la región por transcribir. De esta manera, la RNA polimerasa tiene acceso a la hebra patrón que da lugar al inicio de la síntesis de una hebra de RNA complementaria (ésta será idéntica a la hebra de DNA únicamente cambiando el uracilo por timina).

La molécula de RNA transcrita se sintetiza en dirección de 5' hacia 3'.

La unión entre la RNA polimerasa y el promotor es mediada por proteínas conocidas como factores de transcripción. Estos factores localizan al promotor y fijan la RNA polimerasa. El promotor es una región del DNA que contiene la secuencia TATAAT, conocida como caja TATA, misma que se encuentra en la posición -10 a 35 bases antes del sitio de inicio de transcripción (río abajo), y en la región -35 se encuentra la caja TTGACA (síntesis de la molécula de RNA). Mientras se realiza este proceso, las hebras de DNA sólo se separan por una extensión de aproximadamente 20 a 30 pb,

www.elsolucionario.org

Cuadro 4-1. RNA polimerasas eucariotas y sus principales características

Clase	Genes transcritos	Características
RNA Pol I	rRNA 28S, rRNA 18S, rRNA 5.8S	Se localiza en el nucleolo. Sintetiza sólo un transcrito primario (rRNA 45S), el cual produce las tres clases de rRNA mencionadas
RNA Pol II	mRNA, la mayoría de los snRNA	Sus transcritos son los únicos que están sujetos a adición de casquete y cola de poli-A
RNA Pol III	rRNA5S, todos los tRNA, snRNA U6, RNA 7SL, RNA 7SK, RNA 7SM	El promotor de algunos de estos genes es interno (rRNA 5S, tRNA, RNA 7SL), y en otros está localizado río arriba (RNA 7SK)

con la finalidad de dar acceso a la RNA polimerasa, durante la transcripción de RNA polimerasa de 5' a 3' de la hebra codificadora, y continúan forzando la separación de la doble espiral. Mientras tanto, la fracción ya sintetizada de RNA se separa con rapidez de la hebra patrón y las dos hebras de DNA de la doble espiral se vuelven a unir, manteniendo la misma distancia de 15 a 20 pb. La transcripción se da por terminada cuando la RNA polimerasa se separa de la hebra de DNA complementaria.

En algunos genes puede haber varios complejos de RNA polimerasa actuando en la transcripción simultánea del mismo gen, por lo que la velocidad de producción de RNA aumenta; también se puede tener una traducción simultánea por varios ribosomas de una misma hebra de mRNA durante la síntesis de proteínas.

Las moléculas de mRNA se modifican agregando o eliminando secuencias de bases antes de que sean exportadas al citoplasma. Es decir, el pre-mRNA o mRNA primario que se encuentra dentro del núcleo tiene una larga secuencia de bases: este RNA sufre un corte o eliminación de secuencias intrones y se produce así una cadena de RNA más corta, conocida como mRNA maduro, mismo que contiene únicamente exones. El mRNA maduro puede alcanzar hasta 10% de la cadena original de pre-RNA o RNA primario, para posteriormente ser transportado al citoplasma.

En los vertebrados, la mayoría de los exones codifican menos de 50 aminoácidos.

En los genomas virales dependientes de RNA ocurre la transcripción inversa, que es catalizada por la enzima transcriptasa reversa o inversa, donde la información genética fluye de RNA a DNA.

En el proceso de la transcripción reversa, la DNA polimerasa depende del RNA viral que codifica la transcriptasa reversa y moléculas de DNA utilizando como molde una cadena de RNA. Posteriormente se copian las moléculas de RNA mensajero en forma de moléculas de cDNA, denominadas DNA copias o complementarias, que tienen como característica una secuencia codificante sin intrones.

RNA heteronuclear (hnRNA o pre-mRNA)

Es la copia primaria en espejo del gen producida por las células eucariotas; su procesamiento posterior producirá un RNA funcional o maduro.

Inmediatamente después del inicio de la transcripción se adiciona una guanina (denominada *cap* en inglés, o caperuza) al extremo 5' con posición invertida respecto a los demás nucleótidos por la enzima guanililtransferasa.

El extremo 3' también tiene una especialización con 200 residuos de adenina, denominada cola poli (A), que se agrega al RNA después de la transcripción por la enzima poli (A)-polimerasa.

RNA mensajero (mRNA)

Es el que lleva la información genética desde el núcleo hasta el citoplasma. Se deriva de un proceso de corte y empalme a partir de una copia inicial de hnRNA. El mRNA forma la plantilla sobre la que se fabrican los polipéptidos en la traducción por el ribosoma. Está compuesto por una sola cadena sin ningún enlace intramolecular de hidrógeno. Representa de 3 a 5% del total de RNA celular.

RNA de transferencia (tRNA)

Este RNA transporta aminoácidos específicos a la zona de síntesis de proteínas. Tiene dos sitios activos que le permiten efectuar sus funciones; es una molécula lineal con un promedio de 76 nucleótidos, y tiene un fuerte emparejamiento intramolecular de sus bases que le da forma de hoja de trébol. Representa de 5 a 7% del total de RNA celular.

RNA ribosomal (rRNA)

El rRNA se encuentra en estrecha relación con los ribosomas, los cuales en células eucariotas se encuentran

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

formados por dos subunidades desiguales compuestas por proteínas y RNA que se conocen como subunidad S (pequeña) y subunidad L (grande). Este RNA es el más abundante, y representa de 85 a 90% del total de RNA celular.

RNA de doble cadena (dsRNA)

Este tipo de RNA no se expresa comúnmente en las células; sólo se ha encontrado en casos de infección viral, donde incrementa la respuesta inmunitaria antiviral, aunque también existen hipótesis de que puede tener ciertas funciones en el crecimiento y desarrollo de células normales y tumorales. Por ejemplo, la línea celular de células tumorales HeLa expresa dsRNA en 2 a 5%, el cual es resistente a la degradación por RNasa T1, pero sensible a la RNasa III (enzimas que degradan el RNA).

RNA pequeño de interferencia (siRNA)

Es conocido en inglés como *small interfering RNA*. En 1998, Andrew Fire y Craig Mello le dieron este nombre a dsRNA pequeños con propiedades inhibitorias muy potentes de genes endógenos. Este tipo de RNA tiene una longitud de 21 a 23 pb y es específico para la secuencia que tiene su mRNA blanco, de tal manera que interfiere con su acción y, en consecuencia, con la expresión génica.

Los dsRNA largos son la fuente de los siRNA en el núcleo, ya que la enzima dícer, un tipo especial de endonucleasa multidominio de la familia RNasa III de 220 kDa, procesa los dsRNA para generar siRNA. Posteriormente los siRNA son ensamblados en complejos (*RNA-induced silencing complexes,* o RISC) de 200 a 360 kDa, los cuales degradan a sus mRNA blanco. Los complejos RISC contienen, además de RNA, proteínas dícer junto con otro tipo de nucleasas, proteínas R2D2 de unión a dsRNA, RNA helicasas, etc. (figura 4-19). Actualmente, la ribointerferencia se considera un fenómeno de cosupresión, silenciamiento postranscripcional y extinción *(quelling).*

Además de los tipos de RNA descritos, existen muchos RNA especializados con funciones reguladoras o catalíticas, solos o unidos a proteínas, como en el caso de la enzima telomerasa, que en realidad en una ribonucleoproteína.

Los RNA pequeños como el nuclear (snRNA), el nucleolar (snoRNA) y el citoplasmático (scRNA), representan de 3 a 5% del total de RNA celular.

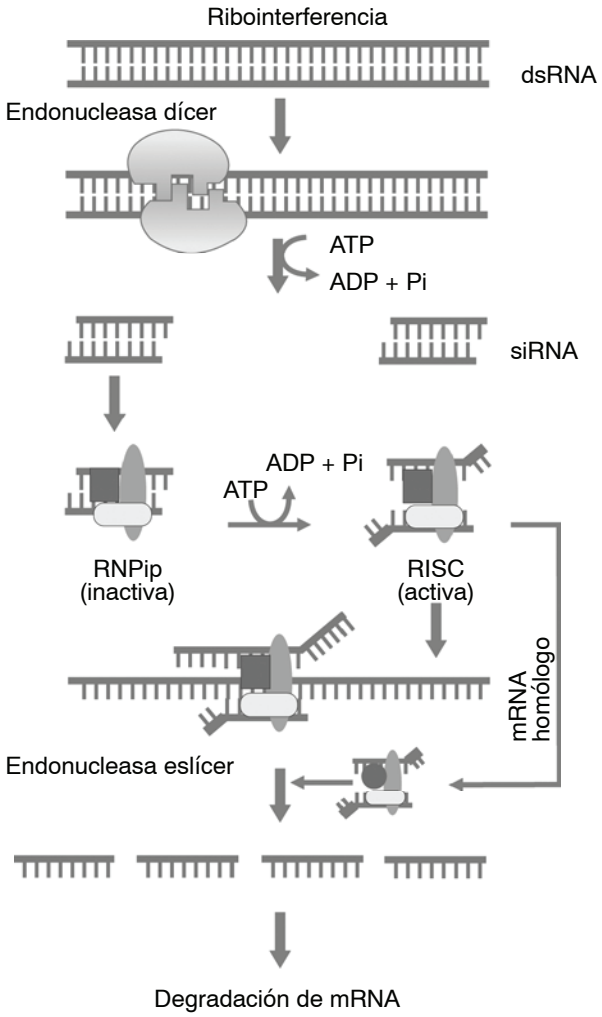


Figura 4-19. Esquema de la formación de siRNA a partir de dsRNA y el mecanismo de inactivación del mRNA o ribointerferencia.

Maduración del RNA

Al RNA recién formado se le llama transcrito primario, y corresponde en secuencia de pb al gen. En los eucariotas, las secuencias que codifican el polipéptido, o exones, pueden no ser contiguas, ya que se interrumpen por secuencias no codificantes, denominadas intrones. Los genes que codifican las histonas son una excepción, ya que no tienen intrones.

Los intrones se cortan y eliminan del transcrito primario, por lo que su longitud se reduce notablemente, a veces hasta alcanzar 10% de la molécula de preRNA, lo que origina que los exones contiguos se empalmen formando un RNA maduro funcional. Este proceso se denomina de corte y empalme (o *splicing,* por su nombre en inglés). Las secuencias codificadoras o exones son las únicas que forman parte de la molécula

www.elsolucionario.org

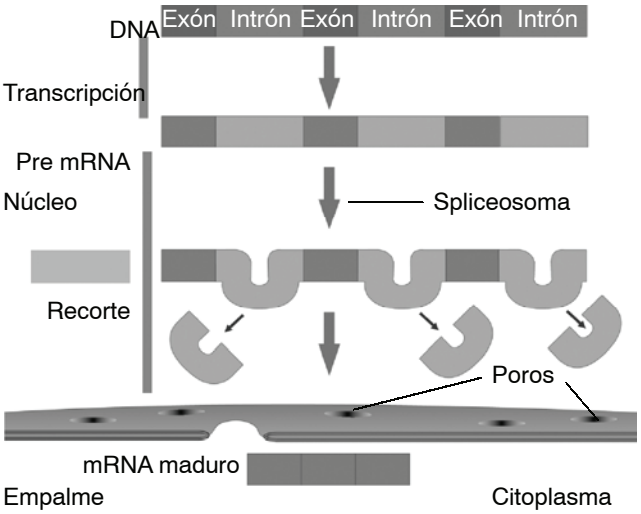


Figura 4-20. Esquema de la maduración del RNA. Al RNA recién formado se le llama transcrito primario, y corresponde en secuencia de pb al gen, el cual es procesado por el spliceosoma para formar mRNA.

de mRNA madura que es exportada al citoplasma (figura 4-20). En los mRNA eucarióticos la mayoría de los intrones oscilan entre 50 y 20 000 nucleótidos, mientras que los exones tienen menos de 1 000 nucleótidos, con un valor promedio de 100 a 200 pb.

Los mRNA eucarióticos, además, tienen modificaciones postranscripcionales, como la adición del casquete o caperuza en el extremo 5' formado por una molécula de trifosfato de 7-metilguanosina, mientras que la cola de poli(A) se forma de polímeros de adenina que contiene de 20 a 250 residuos adenilato en el extremo 3'.

En el tRNA existen además bases púricas y pirimídicas modificadas que lo hacen más resistente a la destrucción enzimática por las ribonucleasas, y los rRNA se forman a partir de precursores más largos, denominados RNA prerribosómicos.

La mayoría de las células tienen alrededor de 40 a 50 tRNA diferentes, y se pueden agrupar dos o más tRNA diferentes sobre un único transcrito primario. Los precursores de tRNA pueden tener también otros dos tipos de modificación postranscripcional, como la adición enzimática del trinucleótido 3'-terminal CCA característico de los tRNA y la modificación de algunas bases por metilación, desaminación o reducción durante el proceso de maduración final del tRNA.

Degradación del RNA

Las enzimas que degradan el RNA son de dos tipos: las endonucleasas, que fragmentan el RNA en puntos internos de la hebra, y las exonucleasas, que lo degradan por los extremos. Cuando el mRNA cumple con su función, se degrada en una serie de pasos que inicia con la desadenilación del extremo 3' por exonucleasas, seguido de la eliminación de la caperuza por enzimas destapadoras (en inglés, *decapping*). Cuando el mRNA queda sin caperuza, es degradado rápidamente desde el extremo 5' por la exonucleasa 5'-3' XRN1, o puede también ser degradado desde el extremo 3' por la actividad exonucleasa 3' a 5' de cinco tipos de enzimas que interactúan en complejos denominados exosomas.

Cosupresión

Este mecanismo es similar al explicado anteriormente con el siRNA o de ribointerferencia, y consiste en una inhibición postranscripcional conjunta de la expresión de genes endógenos y de sus copias transgénicas.

Extinción *(quelling)*

Esta palabra fue utilizada por primera vez por los investigadores italianos Nicoletta Romano y Giuseppe Macino en 1992, cuando estudiaban al hongo filamentoso *Neurospora crassa*. Este fenómeno de cosupresión consiste en una inhibición transitoria de la expresión de genes específicos mediante la introducción de secuencias transgénicas homólogas.

Intrones

El biólogo molecular británico Frederick Sanger recibió dos veces el premio Nobel de química: en 1958 por sus trabajos acerca de la estructura de las proteínas, en especial los que se refieren a la insulina, por establecer la constitución de las cadenas A y B de la insulina mediante el ataque de la molécula proteica por hidrólisis ácida y por digestión enzimática para romper su cadena de aminoácidos, y en 1980, junto con Paul Berg y Walter Gilbert, volvió a ser galardonado con el Nobel por sus contribuciones a la determinación de las secuencias de bases en los ácidos nucleicos donde se descubrieron los intrones. Como ya se ha señalado en el capítulo, en los organismos superiores los genes están interrumpidos entre la secuencia de nucleótidos que codifican un polipéptido en particular. Puede haber una o más interrupciones de secuencias no codificantes. Durante la transcripción, los intrones se transcriben en el RNA junto con las secuencias codificantes (exones), originando

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

una molécula de pre-mRNA. En el núcleo, las secuencias intrónicas se eliminan del RNA por unas enzimas especiales contenidas en un complejo de spliceosoma para formar el mRNA maduro, que se exporta al citoplasma. Las funciones de los intrones se desconocen, pero se cree que este procesamiento está implicado en la regulación de la cantidad de polipéptidos producidos por los genes. Después de la eliminación de intrones, la reunión de los exones debe ser muy específica, es decir, la unión entre éstos tiene que ser exactamente entre el último nucleótido del primer exón y el primer nucleótido del segundo exón.

Spliceosoma

Es un complejo formado por cinco RNAs pequeños nucleares (snRNAs: *small nuclear RNAs*): U1, U2, U4, U5 y U6 y proteínas para formar ribonucleoproteínas pequeñas nucleares (snRNP), de las cuales existe una por cada snRNA: U1 snRNP, U2 snRNP, U4 snRNP, U5 snRNP y U6 snRNP.

Las snRNP reconocen sitios específicos del RNA heterogéneo nuclear o pre-mRNA (hnRNA) y mediante su interacción catalizan las dos reacciones rápidas y específicas de transesterificación de corte y empalme *(splicing)*.

RNA AUTOCATALÍTICOS O RIBOZIMAS

Las ribozimas son RNA con actividad catalítica, de forma intrínseca, realizan ruptura de enlaces y forman enlaces covalentes reversibles independientes de proteínas asociadas, pero dependientes de magnesio. Actualmente se han descubierto casi 100 ribozimas en diversos seres vivos. En 1989, Sidney Altman y Thomas Cech recibieron el premio Nobel de Química por el descubrimiento de las propiedades biocatalíticas del RNA. Se cree que en las ribozimas subyació la primera información genética surgida en la Tierra con la célula ancestral universal que dio origen a todos los seres vivos. Existen cuatro clases de RNA autocatalíticos:

RNA de la RNAsa P

Esta ribozima participa en el procesamiento de los precursores del tRNA. En 1981, Sidney Altman describió por primera vez el RNA autocatalítico y lo bautizó con el nombre de RNasa P.

Intrones autocatalíticos del grupo I

Después del descubrimiento de la RNAsa P, los intrones autocatalíticos del grupo I fueron descubiertos en 1982 por Thomas Cech. Él encontró que un intrón de 414 nucleótidos del rRNA del protozoario ciliado *Tetrahymena thermophila* poseía propiedades autocatalíticas. Estas ribozimas miden un poco mas de 400 pb de longitud y se localizan en el rRNA, el tRNA y el mRNA, así como en el DNA mitocondrial. Contienen nueve dominios, denominados P1 a P9, que tienen sitios de procesamiento 5' y 3', y poseen una secuencia guía interna (IGS). El RNA intrónico se une al nucleósido guanosina de la caperuza, autocatalizándose (figura 4-21).

Intrones autocatalíticos del grupo II

Se localizan en ciertos hongos y en cloroplastos. Estas ribozimas se autocatalizan liberando el intrón en forma de lazo y uniendo los exones adyacentes. Poseen seis dominios estructurales, numerados del 1 al 6, que contienen dos regiones: una de sitios de enlace al exón (EBS) y la otra del sitio de enlace al intrón (IBS). La interacción entre estas dos regiones es similar al procesamiento del pre-mRNA por el spliceosoma.

Dominios de RNA autocatalíticos

En este grupo se ubica la ribozima denominada cabeza de martillo, dependiente de magnesio, con forma de "Y"

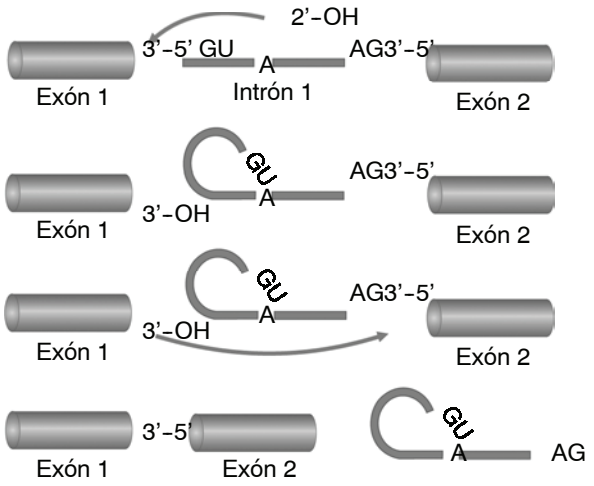


Figura 4-21. Esquema de una ribozima del tipo intrón autocatalítico del grupo I. El RNA intrónico se une al nucleósido guanosina de la caperuza autocatalizándose, para permitir la unión de los exones adyacentes.

www.elsolucionario.org

con los brazos 1 y 2 de ésta y la base que forma el tercer tallo. Su región catalítica contiene dos secuencias consenso: la primera CUGA ubicada en la posición C3-A6 y la segunda que forma una repetición del dinucleótido GA.

RETROTRANSCRIPCIÓN

Transcriptasa reversa o inversa

Es la síntesis de RNA y DNA dependientes de RNA que se observa en ciertos virus constituidos por RNA denominados retrovirus. Estos virus contienen una DNA polimerasa dirigida por RNA que se conoce como transcriptasa reversa o inversa porque forma DNA a expensas de un molde de RNA, en una reacción de sentido contrario al que realizan las DNA polimerasas. En el interior de la célula, la transcriptasa reversa cataliza la síntesis de DNA a expensas de RNA, posteriormente degrada la hebra de RNA original y luego replica la hebra de DNA recién sintetizada para incorporarla al genoma de la célula infectada. Las enzimas transcriptasas reversas, al igual que las RNA polimerasas, no tienen actividad correctora de mutaciones y, por lo tanto, cometen un error cada 20 000 nucleótidos, lo que agrava el riesgo de aparición frecuente de nuevas cepas de virus patógenos, burlando así la defensa inmunitaria y acelerando la evolución viral. Las transcriptasas reversas se utilizan en biotecnología para las síntesis de DNA complementarios (cDNA) a partir de cualquier molde de RNA, como en el caso de la reacción de retrotranscripción y amplificación génica por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) para estudiar la expresión génica a partir de RNA purificado.

RNA replicasa

Los bacteriófagos de *E. coli,* que son virus de RNA, realizan la replicación de su RNA viral por medio de una RNA polimerasa dirigida por RNA, conocida como RNA replicasa. La síntesis se realiza en la dirección 5' a 3' con la misma incapacidad correctora de pruebas de la transcriptasa reversa; asimismo, su frecuencia de errores o mutaciones es similar.

Telomerasa

La telomerasa es un complejo de RNA y proteína que forma una ribonucleoproteína en la que el RNA contiene la copia de la secuencia A_xC_y adecuada, en donde la *x* y la *y* pueden ser de uno a cuatro nucleótidos. Esta parte de RNA actúa como molde para la síntesis de la hebra T_xG_y del telómero. Esta enzima incorpora secuencias finales en los extremos de los cromosomas conocidos como telómeros y tiene características similares a la transcriptasa reversa. Los telómeros contienen por lo general muchas copias en tándem de secuencias cortas de oligonucleótidos de la forma T_xG_y en una hebra y A_xC_y en la hebra complementaria. Actúa como transcriptasa reversa porque sólo sintetiza un segmento de DNA complementario con base en un molde de RNA durante la etapa S del ciclo celular para evitar el acortamiento de los telómeros y, por ende, el envejecimiento celular. Las células que tienen actividad de telomerasa activa, como las cancerosas, son inmortales porque sus telómeros no se acortan. En el ser humano, las células somáticas, aunque contienen el gen de la telomerasa, por lo general no lo expresan, y en consecuencia tienen un número finito de divisiones celulares, porque en cada una de ellas los cromosomas se van acortando a expensas de los telómeros.

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

www.elsolucionario.org

Capítulo 5

Genoma humano y herencia

Dolores Javier Sánchez González, Ismael Vásquez Moctezuma, Nayeli Isabel Trejo Bahena

INTRODUCCIÓN

Los seres humanos tenemos 46 cromosomas en nuestras células somáticas (2 cromosomas sexuales y 22 pares autonómicos o cromosomas no sexuales). Los hombres tienen la fórmula genética 46, XY y las mujeres 46, XX. Estos cromosomas se forman de dos moléculas de DNA muy largas. Los genes se delimitan por intervalos de una de las moléculas de DNA, y su ubicación se denomina *locus*. La mayoría de los genes portan la información necesaria para sintetizar una o más proteínas. Los pares de cromosomas autosómicos (uno del padre y otro de la madre) contienen la misma información genética con los mismos genes, los cuales pueden tener algunas variaciones en su secuencia de DNA, hecho que se conoce como polimorfismo.

Estas diferencias se presentan en menos de 1% de la secuencia de DNA y producen variantes de los genes que se conocen como alelos. Debido a que los cromosomas autosómicos se encuentran en pares, existen dos copias de cada gen. Si uno de estos genes falla, el otro puede codificar su producto y compensar de tal manera que la alteración no tenga relevancia clínica, lo cual se conoce como enfermedad recesiva porque el gen se heredó en un patrón recesivo. Sin embargo, si un solo gen anormal produce la enfermedad, entonces se considera un trastorno hereditario dominante. A los portadores de genes anormales heredados de un solo progenitor se les denomina heterocigotos para dicho gen, pero, si heredan el gen recesivo de ambos padres, entonces manifestarán la enfermedad y serán homocigotos para el gen en cuestión. Los heterocigotos para un gen recesivo son portadores y generalmente no expresan clínicamente el fenotipo.

Los trastornos de un solo gen se conocen como trastornos mendelianos; estos defectos tienen una tasa de incidencia de 1 por cada 200 personas, aunque se han detectado cerca de 6 000. Estos trastornos se caracterizan por un patrón de transmisión familiar conocido como pedigree. El término "linaje" se refiere a los familiares que quedan fuera del árbol genealógico en estudio. La persona afectada se conoce como probando o caso índice.

Código genético

Cada aminoácido está representado por tres nucleótidos (64 combinaciones = 4^3); las cuatro bases del mRNA (A, G, U y C), combinadas 3 a 3, 4 x 4 x 4, forman 64 combinaciones o tripletes. A cada triplete se le llama codón. La correspondencia entre tripletes y aminoácidos es el código genético, que a veces es redundante o degenerado porque más de un triplete codifica el mismo aminoácido. Nunca es ambiguo, ya que ningún codón especifica más de un aminoácido.

Como los codones están uno al lado del otro sin separación, podrían leerse hasta tres mensajes distintos. Lo que determina la pauta de lectura es la señal (codón de iniciación AUG) para el inicio de la traducción. Por lo tanto, para encontrar un mensaje en un gen, ha de empezarse por el triplete ATG, que especifica el aminoácido metionina, por lo que las proteínas empiezan por metionina. Hay tres señales de paro o detención (*stop):* UAA, UAG y UGA.

La región codificante es el segmento de mRNA que codifica una proteína. Los aminoácidos que están repre-

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

Cuadro 5-1. Esquema del código genético o código de aminoácidos

Primera posición (terminación 5')	Segunda posición U	Segunda posición C	Segunda posición A	Segunda posición G	Tercera posición (terminación 3')
U	UUU Phe UUC Phe UUA Leu UUG Leu	UCU Ser UCC Ser UCA Ser UCG Ser	UAU Tyr UAC Tyr **UAA*** **UAG***	UGU cys UGC cys **UGA*** UGG Trp	**U C A G**
C	CUU Leu CUC Leu CUA Leu CUG Leu	CCU Pro CCC Pro CCA Pro CCG Pro	CAU His CAC His CAA Gln CAG Gln	CGU Arg CGC Arg CGA Arg CGG Arg	**U C A G**
A	AUU Ile AUC Ile AUA Ile **AUG Met** Inicio	ACU Thr ACC Thr ACA Thr ACG Thr	AAU Asn AAC Asn AAA Lys AAG Lys	AGU Ser AGC Ser AGA Arg AGG Arg	**U C A G**
G	GUU Val GUC Val GUA Val GUG Val	GCU Ala GCC Ala GCA Ala GCG Ala	GAU Asp GAC Asp GAA Glu GAG Glu	GGU Gly GGC Gly GGA Gly GGG Gly	**U C A G**

* Término.

sentados por más de un triplete son los que se utilizan con más frecuencia. Puede no ser importante el reconocer bien la tercera base de un triplete, por lo que su interacción no es tan fuerte; a este fenómeno se le denomina balanceo o bamboleo. Los tripletes que se diferencian en la tercera posición codifican aminoácidos muy parecidos, lo que disminuye el efecto de las mutaciones. En la mayoría de los casos, los codones que codifican para el mismo aminoácido sólo difieren en la tercera base (cuadro 5-1).

GENOMA

Es la estructura en secuencia y ordenamiento de todos los cromosomas de una especie. Cada molécula de DNA se empaqueta en un cromosoma separado, y la información genética total almacenada en los cromosomas de un organismo constituye su genoma. El valor C determina la cantidad total del DNA haploide completo, y oscila entre 10^6 pb en el caso de los micoplasmas hasta más de 10^{11} pb en plantas y anfibios. El genoma humano, descifrado en junio del año 2000, contiene dos copias de cada cromosoma, una heredada del padre y otra de la madre, que en conjunto suman 3.3 X10^9 pb o 3 300 megabases (figura 5-1). En los cromosomas sexuales esta regla se repite en las mujeres que tienen fórmula XX; sin embargo, en el hombre los cromosomas sexua-

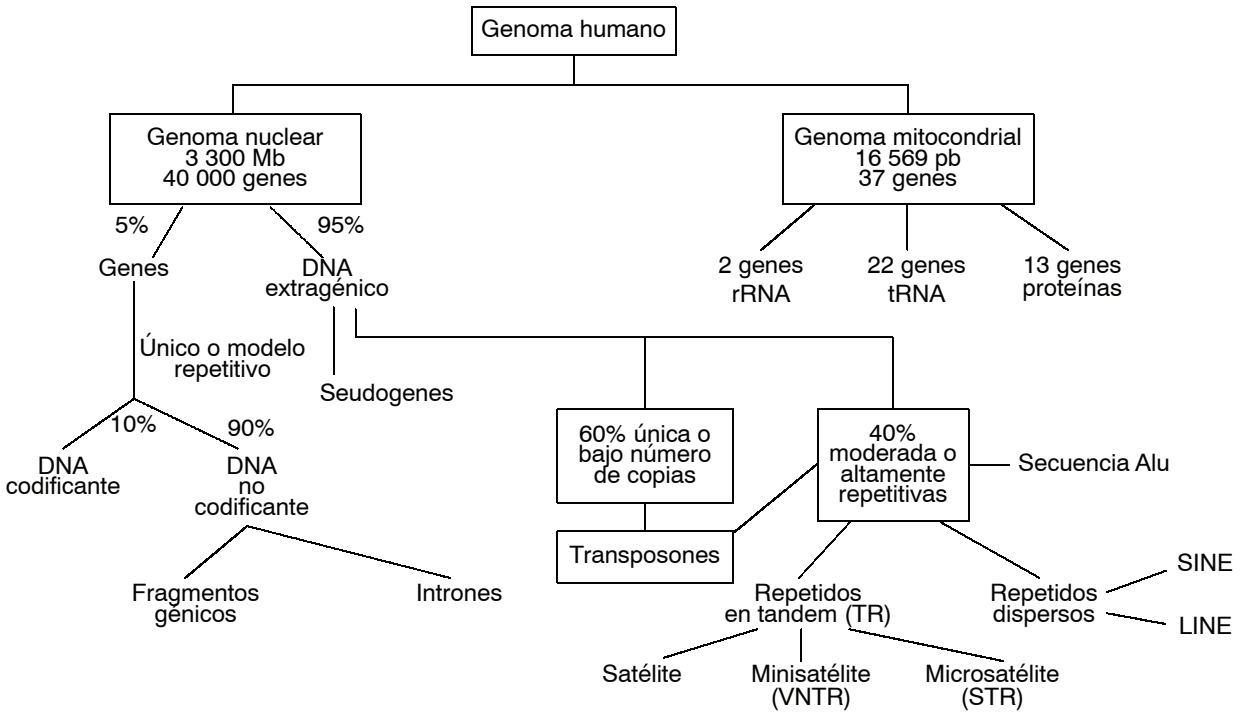


Figura 5-1. Esquema de la composición del genoma humano con sus componentes nuclear y mitocondrial. El genoma humano, descifrado en junio del año 2000, contiene dos copias de cada cromosoma, una heredada del padre y otra de la madre, que en conjunto suman 3.3 X10^9 pb o 3 300 megabases.

www.elsolucionario.org

les son diferentes: el cromosoma sexual Y es aportado por el padre y el cromosoma sexual X por la madre, de tal manera que son copias únicas. Los cromosomas humanos cambian su estructura y actividad de acuerdo con el estado de la célula en relación con el ciclo celular: en la fase M o mitosis se condensan y son transcripcionalmente inactivos, pero en la interfase se descondensan y se vuelven muy activos en la síntesis de RNA.

Se considera que en los seres humanos existen alrededor de 40 000 genes y que sólo de 5 a 10% del genoma codifica para proteínas o para moléculas de RNA. Además de replicarse a sí mismo, la función principal del genoma codificante es copiar secuencias de DNA en secuencias de RNA, proceso denominado transcripción. El RNA copiado puede ser un pre-mRNA, que luego de ser procesado puede dar lugar a varios mRNA maduros y codificar para una proteína o más de una. El rRNA y el tRNA también se transcriben a partir del genoma. Se dice entonces que cada región del DNA que produce una molécula de RNA funcional constituye un gen.

Transposones

En los genomas existen elementos transponibles, o transposones, que contribuyen también a su variación entre individuos. Estas secuencias de DNA son móviles y pueden cambiarse por sí mismas a diferentes sitios en el genoma sin necesidad de vectores. La transposición no está regida por las secuencias de las regiones donantes y receptoras, y sirve como vehículo para los sistemas de recombinación, funcionando como región homóloga portátil. La transposición puede formar una recombinación recíproca o dar lugar a deleciones, inversiones, inserciones o translocaciones. Se han identificado ciertas proteínas responsables de la transposición, las cuales se denominan transposasas.

Retroposones

Los retroposones eucariotas, también conocidos como retrotransposones, tienen relación con algunos provirus retrovirales en su conformación. Este mecanismo de transposición requiere por fuerza de un RNA intermediario.

Proyecto Genoma Humano

El Proyecto Genoma Humano (PGH) consistió en secuenciar los 3 300 millones de nucleótidos, pares de bases o letras (A, T, G, C) y el mapa de localización de los casi 40 000 genes que lo componen. Se encontró que de 3 000 a 5 000 genes son causantes de enfermedades genéticas. Además, se demostró que los seres humanos compartimos 99.9% del genoma. El restante 0.1% varía entre cada individuo, siendo las variaciones más comunes los polimorfismos o cambios de un nucleótido simple o SNP *(single nucleotyde polymorphysm)*. Sólo una de cada 1 000 bases difiere de un ser humano a otro; hasta el momento se han identificado cerca de 3.3 millones de estas diferencias, muchas de las cuales son intrascendentes. La variación genómica entre individuos da como resultado que cada miembro de nuestra especie tenga características genómicas únicas. Cerca de 35% del genoma contiene secuencias repetidas, lo que se conoce como DNA basura, 25% del genoma humano está casi desierto (espacios libres entre un gen y otro). Existe al menos 98% de identidad con el DNA de los chimpancés y otros primates. También se encontró que el ser humano tiene sólo el doble de genes que la mosca del vinagre y un tercio más que el gusano común *C. elegans*. Sólo 5% del genoma codifica proteínas, y se calcula que existen unas 250 000 a 300 000 proteínas distintas; por lo tanto, cada gen podría estar implicado en la síntesis de 10 proteínas en promedio. La siguiente fase, denominada Proyecto Proteoma Humano (HUPO), representa una nueva fase en el estudio de los genes, tomando en cuenta que las proteínas representan el segundo nivel de expresión génica (traducción génica). El Proyecto HapMap consiste en desarrollar un mapa de constitución genética de un individuo con respecto a uno de los miembros de un par de genes alélicos (haplotipos) y los SNP específicos que identifican al genoma humano; su objetivo es explorar el genoma en relación con los fenotipos y las variaciones genéticas que afecten a la salud y la enfermedad.

BASES MOLECULARES DE LA HERENCIA

Historia de la genética humana

950 a. C. Los babilonios efectúan la polinización de las palmeras.
323 a. C. Aristóteles analiza la naturaleza de la reproducción y la herencia.
100-300. En la India se escriben textos sobre la reproducción humana.
1595. Zacharias Janssen construyó el primer microscopio.

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

1665. Robert Hooke (1635-1703) descubre que todos los organismos vivos están compuestos por células.
1676. Anton van Leeuwenhöek (1632-1723) confirmó la reproducción sexual de las plantas.
1677. Anton van Leeuwenhöek (1632-1723) contempló el espermatozoide por medio del microscopio.
1699. Marcelo Malpighi (1628-1694) fundó la histología.
1751. Robert Whiytt (1714-1766) estudia los movimientos vitales en los animales.
1791. Luigi Galvani (1737-1798) estudia la electricidad en las contracciones musculares.
1838. Matías Schleiden (1804-1881) y Teodoro Schwann (1810-1882) propusieron la teoría celular.
1859. Charles Darwin (1809-1882) hace pública su teoría sobre la evolución de las especies.
1866-1869. John Gregory Mendel (1822-1884) describe las unidades fundamentales de la herencia (genes).
1868. Friedrich Miescher aisló por primera vez el DNA en el núcleo de una célula.
1883. Sir Francis Galton (1822-1911) propone el término eugenesia para describir la ciencia que tiene por objeto el estudio teórico y práctico de la posibilidad de mejorar la especie humana por cruzamiento de individuos superiores.
1887. Se descubre que los gametos son células diferentes del resto del cuerpo.
1901. William Sutton afirma que los genes se encuentran en los cromosomas, mismos que varían según la especie.
1908. Se inician los modelos matemáticos de las frecuencias génicas en poblaciones mendelianas.
1909. Se acuña el término de genes para describir a las unidades fundamentales de la herencia biológica.
1910. Se afirma que los genes están en los cromosomas.
1913. Se afirma que los cromosomas tienen series lineales de genes.
1925. Se descubre que la actividad de los genes se relaciona con su posición en los cromosomas.
1927. Se descubre que los rayos X son causantes de mutaciones en los genes, las cuales se describen como cambios morfológicos de los genes.
1944. O. T. Avery, C. MacLeod y M. McCarthy demuestran que el DNA es la molécula genética de la herencia con sus experimentos realizados sobre el *Pneumococcus pneumoniae*.
1945. Se descubre que un gen codifica una proteína (dogma central de la biología molecular) (figura 5-2).
1953. James Watson y Francis Crick proponen la estructura en doble hélice del DNA.
1956. Jo Hin Tjio y Albert Levan identifican los 23 pares de cromosomas de las células somáticas humanas.

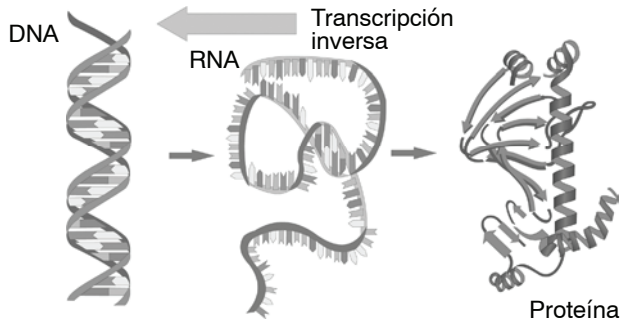


Figura 5-2. Esquema del dogma central de la biología molecular actualizado. La transferencia de la información genética puede ser en ambas direcciones, del DNA al RNA y del RNA al DNA en el caso de la transcripción inversa.

1958. Matthew Meselson y Franklin Stahl demostraron que el DNA se replica de manera semiconservativa.
1961. Se descubre que el código genético está en tripletes.
1962. John Gordon clona ranas a partir de células adultas.
1963. J. B. S. Haldane acuña la palabra clon.
1966. Marshall Niremberg, Heinrich Mathaei y Severo Ochoa descifran el código genético.
1967. Se aísla la enzima DNA ligasa, la cual une las hebras del DNA después de la replicación.
1969. Oscar L. Miller y B. R. Beatty demuestran mediante microscopia electrónica la formación de ribosomas en nucleolos. Además, James Shapiero Shapiero y Johnathan Beckwith, de la Universidad de Harvard, aíslan el primer gen.
1970. Howard Temin y David Baltimore, trabajando de manera independiente, aíslan la primera enzima de restricción. Estas enzimas cortan el DNA en sitios específicos.
1972. Paul Berg, de la Universidad de Stanford, produce la primera molécula de DNA recombinante en el laboratorio por combinación de dos organismos diferentes.
1973. Se inician experimentos de ingeniería genética cuando Stanley Cohen y Herbert Boyer crean el primer organismo con tecnología del DNA recombinante denominada *splicing* de genes, con la cual se puede manipular el DNA de los seres vivos.
1975. Se obtienen, por biotecnología, los hibridomas que producen anticuerpos monoclonales.
1976. Se funda en EUA la primera empresa de ingeniería genética, denominada Genentech.
1977. Se fabrica con éxito una hormona humana en una bacteria mediante ingeniería genética y se desarrolla la tecnología de secuenciación del DNA. El embriólogo alemán Karl Illmensee y Hoppe, en Maine, crean

www.elsolucionario.org

ratones de un solo progenitor, tanto de un solo padre como de una sola madre.

1978. Se clona el gen de la insulina humana mediante ingeniería genética.

1981. Se realiza el primer diagnóstico prenatal de una enfermedad humana por medio del análisis del DNA.

1982. Se crea el primer ratón transgénico, denominado superratón, insertando el gen de la hormona del crecimiento en óvulos de ratona fecundados.

1982. Se produce insulina recombinante utilizando técnicas de ingeniería genética.

1983. Kary B. Mullis inventa la técnica de reacción en cadena de la polimerasa PCR, que permite amplificar genes específicos o secuencias de DNA con rapidez.

1984. Se crean las primeras plantas transgénicas por ingeniería genética.

1985. Se emplean interferones en el tratamiento de enfermedades víricas.

Se utiliza por primera vez la "huella génica" en una investigación judicial en Inglaterra y se inicia el primer plan para un proyecto genoma humano a nivel mundial.

1986. Se autorizan las pruebas clínicas para la aplicación de la vacuna contra la hepatitis B obtenida mediante ingeniería genética.

1987. Se comercializa el primer anticuerpo monoclonal terapéutico en humanos.

1988. Se patenta por primera vez un organismo producido por ingeniería genética.

1990. Se realiza el primer tratamiento exitoso mediante terapia génica en niños con trastornos inmunitarios denominados niños burbuja, y se autoriza la concesión de fondos públicos para el Proyecto Genoma Humano por parte de los *Institutes of Health* de EUA.

1993. Se abre el primer campus en Inglaterra para el estudio del genoma humano.

1994. Se comercializa en California, EUA, el primer tomate transgénico, y en Holanda, el primer toro transgénico.

Craig Venter funda un instituto de investigación para el estudio del genoma humano financiado por empresas.

1995. Se terminan las primeras secuencias completas de genomas de los procariotas *Haemophilus influenzae* y *Mycoplasma genitalium,* y se inicia el proyecto de decodificación en gran escala del genoma humano.

1996. Se completa la secuencia de un genoma eucariota, la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. El 5 de julio de 1996 se realiza la clonación del primer mamífero a partir de células adultas, la oveja Dolly por Ian Wilmut y Keith Campbell, e investigadores del instituto escocés Roslin.

1998. Craig Venter funda la empresa Celera Genomics, con el propósito de concluir la decodificación del genoma humano a fines del año 2001.

1999. Se publica el código genético completo del cromosoma humano Nº 22.

2000. El 26 de junio de 2000 se publica el primer borrador del genoma humano completo.

2003. Surge publicidad no confirmada acerca de la clonación de un ser humano.

Estructura de los ácidos nucleicos

Estos ácidos son polímeros lineales de nucleótidos formados por tres componentes: una base nitrogenada (purina o pirimidina), un azúcar pentosa y un fosfato unidos por enlaces fosfodiéster. Las bases nitrogenadas son anillos aromáticos planos heterocíclicos. La adenina (A) y guanina (G) son purinas, y la citosina (C), timina (T) y uracilo (U) son pirimidinas; las primeras cuatro se encuentran conformando el DNA, y en el RNA se cambia la timina por uracilo. Las bases nitrogenadas se encuentran unidas con una pentosa formando un nucleósido. En el RNA, el azúcar es una ribosa y en el DNA es la 2'-desoxirribosa, en el cual el grupo hidroxilo de la posición 2' se encuentra sustituido por un hidrógeno. La unión de las bases y el azúcar es un enlace N-glucosídico que se establece entre el N-1 de las pirimidinas y la posición 1' de la pentosa. El nucleósido se denomina adenosina, guanosina, timidina, histidina o uridina en caso de contener ribosa (ribonucleósido), y en caso de contener desoxirribosa (desoxirribonucleósido) se denominan deoxiadenosina, deoxiguanosina, deoxicitidina o deoxitimidina.

Los nucleótidos se originan por la unión de un grupo fosfato a cada nucleósido en el carbono 5' del azúcar. Para que se forme una cadena de polinucleótidos se une de manera covalente formando un enlace fosfodiéster con el grupo 3'-hidroxilo de la pentosa del nucleótido contiguo; esto permite que se determine la polaridad de la molécula, que puede ir de 5' a 3' o de 3' a 5'.

El DNA se encuentra tridimensionalmente estructurado por una doble hélice compuesta por dos cadenas de polinucleótidos con polaridades opuestas, antiparalelas; así lo describieron Watson y Crick en 1953. Los azúcares y los grupos fosfato quedan en el exterior de la molécula, formando así un polianión debido a las cargas negativas de los grupos fosfato. Las bases son estructuras planas hidrófobas que dan al interior de la hélice. Las cadenas se mantienen unidas mediante puentes de hidrógeno entre las bases nitrogenadas. La manera en que se aparean las bases es de forma complementaria, es decir, la guanina siempre se aparea con citocina por tres puen-

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

Cuadro 5-2. Diferentes conformaciones del DNA

Características	DNA-A	DNA-B	DNA-Z
Distancia/vuelta (nm)	3.2	3.4	4.5
Surco mayor	Estrecho y profundo	Ancho y profundo	Plano
Surco menor	Muy ancho y poco profundo	Estrecho y poco profundo	Muy estrecho y profundo
Forma	Corta y ancha	Larga y muy delgada	Larga y delgada
Giro de la hélice	Dextrógiro	Dextrógiro	Levógiro
Diámetro hélice (nm)	2.55	2.37	1.84
Pares bases por giro completo	11	10	12

tes de hidrógeno, y la adenina con la timina por dos puentes de hidrógeno. Así forman y mantienen un diámetro uniforme de 2 nm, el espacio entre cada par de bases es de 0.34 nm y la molécula completa tiene un giro de 360° cada 10 pares de bases (3.4 nm).

El DNA puede adoptar diferentes tipos de formas helicoidales dependiendo de las características fisicoquímicas en que se formen cristales de la molécula. Por lo general, su estructura tridimensional posee giro hacia la derecha, β-DNA, dextrógiro o tipo "B", la cual es la forma ideal y la más estable; es la que se encuentra de manera más usual en las células procariotas y las eucariotas.

El DNA tipo "A" tiene 11 nucleótidos por vuelta y un diámetro de 2.3 nm; también existen formas dextrógiras (C, D y E) no presentes en las células. Se han descrito estructuras de triples hélices formadas por tres cadenas de polinucleótidos en ciertas regiones del genoma, como en el DNA mitocondrial humano y en los telómeros de los cromosomas; ocasionalmente posee giro hacia la izquierda, denominado z-DNA, levógiro con 12 pb por vuelta de hélice (cuadro 5-2).

En cada cromosoma se encuentran entre 48 y 240 millones de bases de DNA; cada cromosoma tiene una longitud de 1.6 a 8.2 cm con un alto grado de organización para que esta cantidad de DNA se aloje en el núcleo de 5 μm de diámetro.

El DNA se encuentra superenrollado y esto se refiere a la presencia de giros adicionales introducidos a la doble hélice de DNA; este superenrollamiento hace que la molécula de DNA se colapse en un estructura fuertemente compactada.

Existen dos tipos de enrollamiento: en el negativo el DNA gira en sentido opuesto a la doble hélice y en el positivo gira en el sentido de la hélice.

El grado máximo de superenrollamiento negativo se alcanza cuando la doble hélice de DNA queda abierta. Muchas de las funciones biológicas de diferentes organismos se pueden llevar a cabo cuando el DNA se encuentra superenrollado negativamente; la cantidad y la forma de superenrollamiento se llevan acabo por las topoisomerasas, que son enzimas capaces de convertir una forma topológica del DNA en otra.

Las regiones codificantes se denominan exones, mientras que las secuencias que no codifican se denominan intrones. Estas dos secuencias se transcriben textualmente del gen bajo la forma de RNA heteronuclear (hnRNA) y son complementarias a las secuencias del DNA que nunca sale del núcleo. Este hnRNA es el encargado de remover los intrones y reunir únicamente los exones para formar un RNA maduro o funcional.

El DNA de copia única constituye 57% del total en el genoma, formado por segmentos de aproximadamente 1 000 pb de longitud; una pequeña parte de este DNA contiene los genes. El DNA repetitivo equivale a 20% del genoma; son unidades de aproximadamente 300 pb que se repiten en el genoma unas 10^5 veces, denominadas unidades de repetición, intercalándose con el DNA de copia única.

El DNA satélite, muy repetitivo corresponde a 28% del total; son unidades cortas de pares de nucleótidos que se repiten y generalmente se encuentran en la heterocromatina, ya que no se expresa.

Estos patrones de repetición son específicos de cada individuo (huella génica) de la especie y pueden ser separados por centrifugación.

Modificaciones epigenéticas. Metilación

La metilación del DNA es la incorporación de un grupo metilo en la posición 5 de la citocina en el dinucleótido CpG por acción de las enzimas Dnmt1, Dnmt3a y Dnmt3b. Las modificaciones epigenéticas por metilación regulan la represión o el silenciamiento de los genes, ya que los factores de transcripción no pueden unirse al DNA metilado. Otro factor de regulación negativa de la transcripción se debe a que las proteínas MeCP se unen al DNA metilado e interactúan con otras proteínas como el correpresor mSin3, que recluta a desacetilasas de histonas con el objeto de compactar al máximo la cromatina.

www.elsolucionario.org

GENES

Son secuencias lineales de nucleótidos de DNA que determinan la herencia de una característica determinada, o de un grupo de ellas; por lo tanto, son la unidad de la herencia.

Los genes están localizados en los cromosomas y se disponen en línea a lo largo de cada uno de ellos. Se consideran como la unidad de almacenamiento de información y unidad de herencia al transmitir esa información a la descendencia. La realización de esta función no requiere traducción ni su transcripción. Cada gen ocupa en el cromosoma una determinada posición, denominada *locus*.

El conjunto de genes de una especie determina su genoma. Por lo general, el término *locus* se intercambia con el de *gen.* Los genes ejercen sus efectos a través de las moléculas que forman; los productos inmediatos de un gen son las moléculas de RNA, copias exactas del DNA excepto porque en lugar de la base timina tienen uracilo. Sin embargo, sólo se consideran genes las secuencias de DNA que codifican para moléculas funcionales de RNA. Las moléculas de RNA de ciertos genes participan de forma directa en el metabolismo del organismo, aunque su principal función es la producción de proteínas.

Una minoría de los genes nucleares codifica para moléculas maduras de RNA con diversas funciones, como expresión génica (RNA ribosomal, mensajero y de transferencia).

Pocos polipéptidos humanos están codificados por dos o más copias idénticas de un gen, y pueden ser codificados por genes que se han duplicado de manera reciente generando agrupaciones génicas, como el gen de globina alfa.

Algunos genes en cromosomas diferentes codifican para polipéptidos idénticos, como las familias de los genes para histonas.

La gran mayoría de los genes que codifican para cadenas de polipéptidos se encuentran en secuencias de copia única. La secuencia de tripletes de bases (codones) presente en el RNA determina la secuencia de aminoácidos en la proteína por medio del código genético. Por lo tanto, las variaciones en el DNA, como las mutaciones, pueden afectar la estructura o a la química de un organismo. En los organismos superiores, las secuencias no codificadoras superan en 1 000% o más a las codificadoras.

Existen tres grupos de genes según su tipo de expresión:

1. **Específicos de tejido.** Corresponden a 80% del genoma y codifican proteínas con funciones especializadas que pueden ser reguladas por factores externos ambientales o internos, como hormonas, citocinas, etc.
2. **Mantenimiento o *housekeeping genes* (HKG).** Corresponden aproximadamente a 20% del genoma; por lo general no se regulan por factores internos o externos, y su expresión es vital o indispensable para las células, ya que codifican proteínas necesarias para las funciones estructurales y metabólicas básicas de las células. Otra característica importante de estos genes es que se encuentran activos en todas las células, a diferencia de muchos genes específicos de tejido, que pueden estar inactivados.
3. **Genes homeóticos.** Estos genes codifican los factores de transcripción que se unen a ciertas secuencias de DNA y activan o inhiben la transcripción. También están implicados en la morfogénesis del embrión y el feto durante la vida intrauterina. Estos genes tienen en común una secuencia consenso de cerca de 180 pb denominada caja homeótica (*homebox* en inglés) muy conservada en los reinos de la vida, lo que denota un origen común (evolución molecular). La caja codifica para una secuencia de 60 aminoácidos (conocida como homeodominio) agrupados en más de 200 grupos homólogos o parálogos que se pegan al tetranucleótido ATTA en una región del DNA denominada motivo central.

Seudogenes

Son secuencias del genoma que tienen una gran similitud con algunos genes estructurales conocidos, pero no son funcionales; son el producto de eventos de duplicación génica y sus copias adquieren mutaciones en regiones codificantes o reguladoras que las vuelven silenciosas; por ello se les llama seudogenes convencionales o no procesados.

También existen los seudogenes procesados, que se originan por la inserción en el genoma de secuencias de cDNA producidas por la acción de la transcriptasa reversa sobre un mRNA transcrito a partir de un gen funcional.

En algunos casos, los seudogenes procesados se pueden expresar si tienen promotores, como ocurre, por ejemplo, en la secuencia Alu, que es transcrita por la RNA polimerasa III; lo mismo pasa si se localizan en regiones adyacentes a promotores activos.

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

Secuencias Alu

Son secuencias de DNA altamente repetidas de 297 pb, muy ricas en dinucleótidos CpG, que se encuentran en el genoma de primates, las cuales contienen un extremo de 40 pb rico en oligo-dA y que fueron descubiertas en 1990 por Mark A. Batzer y col. Las secuencias Alu se formaron hace 2.8 millones de años en un ancestro común mediante una retrotransposición genética; hasta ahora, la mayoría de los nucleótidos se conservan idénticos con un 98.9% de homología, las cuales se reconocen como posiciones CONSBI (*conserved before insertion*). Estas secuencias son reconocidas por la enzima de restricción Alu I. En genomas humanos se encuentran cerca de 500 000 copias de estas secuencias, que representan de 3 a 6% del genoma. La divergencia de las secuencias Alu en las posiciones CONSBI se puede utilizar como medida del tiempo desde que fueron insertadas, para conocer cuándo se insertaron, cuál ha sido su evolución y si tienen alguna función.

Tipos de genes

Genes estructurales

Tienen la función de codificar para la síntesis de moléculas de proteínas. La mayoría de estos genes se localizan en regiones de DNA no repetitivo (figura 5-3).

Genes redundantes

Son genes que se encuentran presentes en múltiples copias en un genoma, de manera que la mutación o inactivación de un gen no afecta la función.

Operón

Se integra por varios genes estructurales. El gen operador se ubica en el extremo inicial y actúa como interruptor de corriente (operador de encendido y apagado).

En microorganismos, los genes funcionales se encuentran generalmente agrupados en operones en los cuales funcionan de forma coordinada, de manera que las mutaciones de un gen pueden bloquear o alterar la expresión de otros genes en el operón.

Los operones no existen en organismos eucariotas, aunque cada gen tiene su propio sistema individual de promotores y operadores, además de que los intrones y las secuencias repetidas regulan también la expresión génica.

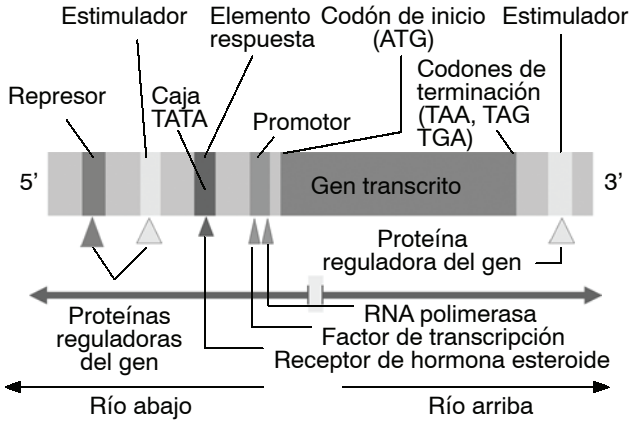


Figura 5-3. Esquema de un gen eucariota. Un gen es una parte de una molécula de DNA que codifica una molécula funcional de RNA. Se muestran algunos de los mecanismos que intervienen en la regulación de la expresión génica.

Gen regulador

El producto de su expresión o proteína (denominada represor) actúa como represor del operón al producir un bloqueo de su expresión.

MAPEO GÉNICO

Los mapas génicos determinan las posiciones relativas de los genes en los cromosomas y la distancia entre ellos. Estos mapas pueden ser:

1. **Mapas físicos.** En estos mapas se determina la distancia entre dos genes por nucleótidos o pb del DNA.
2. **Mapas genéticos o de ligamiento.** Determinan una distancia estadística entre dos genes.

Los dos tipos de mapas son de utilidad en la práctica, como en el aislamiento génico de enfermedades hereditarias; generalmente se hace primero un mapa de ligamiento y después un mapa físico.

HERENCIA HUMANA

Caracteres como los grupos sanguíneos y ciertas características físicas como la talla tienen un componente genético, mientras que otras, como el peso, tienen un com-

www.elsolucionario.org

ponente ambiental. La susceptibilidad a padecer ciertas enfermedades como hipertensión arterial, esquizofrenia, diabetes, varias formas de cáncer, migraña, etc., tiene un componente genético importante. Muchas enfermedades poco frecuentes están originadas por genes dominantes y otras por genes recesivos; se cree que cerca de 4 000 genes humanos están asociados a enfermedades.

Alelo

Son las formas alternativas de un gen que ocupan el mismo *locus* en un cromosoma homólogo y que controlan el mismo rasgo o carácter, denominado alelomorfo. Este concepto fue propuesto en 1901 por el biólogo británico William Bateson, quien también acuñó el término genética en 1905 para designar la ciencia que estudia los fenómenos de la herencia y de la variación. El polimorfismo genético es la coexistencia de alelos múltiples en un *locus* determinado.

Un alelo se etiqueta como polimórfico si está presente en la población con una frecuencia menor de 1%. La diferencia entre los mapas de restricción o de ligamiento de dos individuos se conoce como polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción, o RFLP, de los cuales existen más de 5 000 en todo el genoma y son los sitios donde las enzimas de restricción cortan el DNA. Los haplotipos o genotipos en miniatura corresponden a la combinación específica de RFLP en los individuos, y se usan para describir la combinación de sitios de restricción o de alelos.

Los alelos se denominan con una o más letras y algún símbolo. Se dividen en:

Alelos dominantes

Sólo necesitan una copia del gen para expresarse y se nombran con letras mayúsculas. La función de los alelos se puede medir por su efecto en el fenotipo de los organismos; de esta manera, dos alelos pueden ser codominantes o isomorfos cuando tienen la misma actividad.

Alelos recesivos

Necesitan las dos copias del gen en cuestión para expresarse, se simbolizan con letras minúsculas. Si las mutaciones originan una ganancia de función en las proteínas, se manifiestan de manera dominante, pero si causan una pérdida de función, entonces se manifiestan de manera recesiva.

El alelo más frecuente en una especie se denomina de tipo salvaje (en inglés, *wild type*) y se designa con el símbolo + y su ausencia se designa con el símbolo –, de esta manera (+/–) significa presencia y ausencia de un gen particular. Los alelos mutantes se originan a partir del alelo salvaje por pérdida, sustitución, adición o reordenamiento de uno o más residuos de nucleótidos. Un individuo diploide puede tener en el mismo *locus* alelos iguales o diferentes. Según sus diferencias por mutaciones, los dos alelos pueden ser homoalelos o isoalelos cuando presentan mutaciones en el mismo sitio, o heteroalelos cuando las tienen en lugares diferentes. Por su función, los alelos pueden ser amorfos cuando carecen de actividad o hipomorfos cuando tienen niveles bajos de actividad génica. Los alelos múltiples corresponden a las diferentes variantes de un mismo gen y pueden formar seres heterocigotos con dos alelos mutantes. Para distinguir entre sí a los alelos mutantes, se señalan con superíndices como X^a o X^b.

Transmisión de genes

En el ser humano, los genes se encuentran duplicados: uno procede de la madre y el otro del padre, excepto en los cromosomas X y Y del varón, donde sólo existen copias únicas. Las copias se ubican en la misma posición sobre cada uno de los cromosomas homólogos. Si las dos copias son idénticas, se dice que el individuo es homocigótico para el gen específico, pero si son diferentes, entonces el individuo es heterocigótico para el gen en cuestión. Si un alelo es dominante, se manifiesta; sin embargo, los genes recesivos se pueden manifestar en posteriores generaciones si los individuos son homocigóticos. Por consenso, los alelos se designan siempre por una única letra; los alelos dominantes se representan con una letra mayúscula y los recesivos con una minúscula. Los efectos de B son dominantes; los de b, recesivos. Por lo tanto, en los individuos heterocigóticos (Bb), así como en los homocigóticos (BB), para el alelo en estudio se manifestará la característica, pero si los alelos son bb, entonces no se manifestará. Los hijos de una pareja en la que ambos son heterocigóticos (Bb) tienen 25% de probabilidades de ser homocigóticos BB, 50% de ser heterocigóticos Bb y 25% de ser homocigóticos bb. A estos caracteres observables se les conoce como fenotipo del organismo, y la composición genética que produce estos caracteres se denomina genotipo. Además, los genes pueden controlar más de un carácter, así como también un carácter puede depender de varios genes.

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

Herencia cuantitativa

Los caracteres que se expresan como variaciones en cantidad o extensión, como peso, talla, color de la piel, etc., dependen de varios genes para manifestarse, además de la influencia ambiental. Eventualmente, los efectos de diferentes genes pueden ser aditivos, es decir, producen un pequeño incremento o descenso independiente de los demás genes. Por ejemplo, el color de una flor puede estar determinado por una serie de tres genes: *A, B* y *C.* Si su genotipo es *aabbcc,* la flor es roja y cada sustitución por un par de alelos dominantes disminuye su tono a rosa (*AABBcc*), pero si su genotipo es *AAbbcc,* su color será naranja, y en la que sea *AABBCC* será blanca. Aunque en la práctica los resultados no son tan regulares, la herencia cuantitativa que depende de varios genes se denomina herencia poligénica, mientras que la herencia multifactorial resulta de la combinación de influencias genéticas y del entorno.

Regulación génica

Ciertas células contienen conjuntos de genes idénticos con funciones distintas; de igual forma, algunos genes están activos y otros no en células diferentes. El proceso de la activación génica en los organismos superiores aún no está claro.

Junto a cada gen existe un segmento de DNA conocido como promotor, sobre el cual la RNA polimerasa se adhiere al DNA e inicia la transcripción. Entre el promotor y el gen existe otro segmento de DNA que recibe el nombre de operador, donde una proteína denominada represor puede fijarse y bloquear la transcripción, ya que detiene el desplazamiento de la RNA polimerasa a lo largo del cromosoma y la producción de mRNA. Los genes reguladores codifican para proteínas represoras.

La existencia del RNA fue postulada en 1961 por los genetistas franceses François Jacob y Jacques Lucien Monod, quienes obtuvieron el premio Nobel de Medicina en 1965 junto con André Michel Lwoff por sus descubrimientos relativos al control genético de la síntesis de enzimas y virus. Ellos afirmaban que la síntesis de enzimas está dirigida y regulada por los genes. Esta afirmación fue comprobada por Heinrich Mathaei, Severo Ochoa y Marshall Niremberg, del *Public Health Service* de EUA, quienes añadieron extractos brutos de RNA sobre extractos de *E. coli* con aminoácidos y ribosomas, demostrando que el RNA estimulaba la síntesis proteica, por lo cual, recibieron el premio Nobel de Medicina en 1959.

Leyes de Mendel

El monje austriaco John Gregory Mendel (1822–1884) desarrolló tres leyes, conocidas como leyes mendelianas o de Mendel, entre 1866 y 1869, estudiando más de 27 000 plantas de distintas variedades del chícharo de jardín *Pisum sativum* durante ocho años. Estos experimentos pasaron inadvertidos por la comunidad científica, hasta que en 1900 el alemán Karl Frich Correns, el botánico holandés Hugo de Vries y el austriaco Erich von Tschermack descubrieron su trascendencia; desafortunadamente, Mendel ya había fallecido. Las ventajas de estudiar los chícharos se deben a que su reproducción es muy rápida y las generaciones de padres a hijos se dan en periodos cortos, tienen características contrastantes bien definidas y son hermafroditas porque pueden autofecundarse. La primera generación o paterna se conoce como F_0; los descendientes de la primera generación filial son F_1 y los nietos o segunda generación filial son F_2. Estas leyes son las siguientes:

Primera ley de Mendel o ley de la dominancia

Esta ley dice que para cada característica hereditaria existen genes dominantes y recesivos. Independientemente del padre que aporte el carácter dominante, el híbrido o heterocigoto siempre tendrá fenotipo dominan-

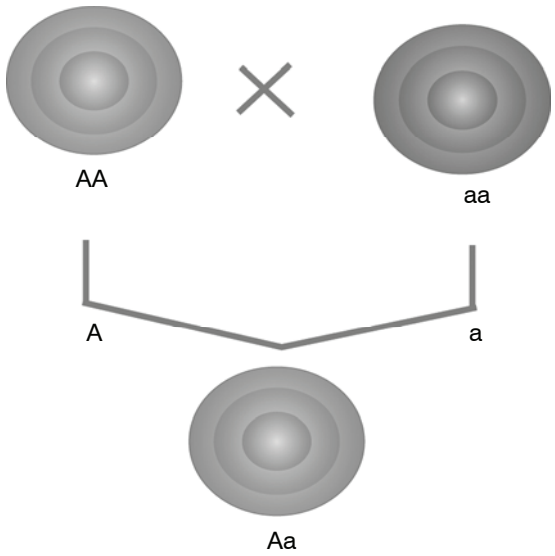


Figura 5-4. Esquema de la primera ley de Mendel o ley de la dominancia. Se muestran las semillas verdes y amarillas del chícharo de jardín *Pisum sativum* que utilizó John Gregory Mendel para esta ley. Al cruzar estas plantas F_0, obtenía siempre chícharos con semillas amarillas (el alelo A es dominante y el a es recesivo).

www.elsolucionario.org

te; además, cuando se cruzan dos individuos homocigotos para un determinado carácter, todos los híbridos de la primera generación tienen el mismo carácter (figura 5-4).

Segunda ley de Mendel o principio de la segregación de caracteres

Un carácter hereditario se transmite como una unidad que no se mezcla, se diluye o se pierde de generación a generación, sólo se segrega o se separa, de tal manera que en los nietos reaparecen proporcionalmente las características de los abuelos (figura 5-5).

Tercera ley de Mendel o de distribución independiente

Dice que un par de alelos se distribuye de manera independiente de otro par, de tal forma que los caracteres se heredan de manera independiente unos de otros (figura 5-6).

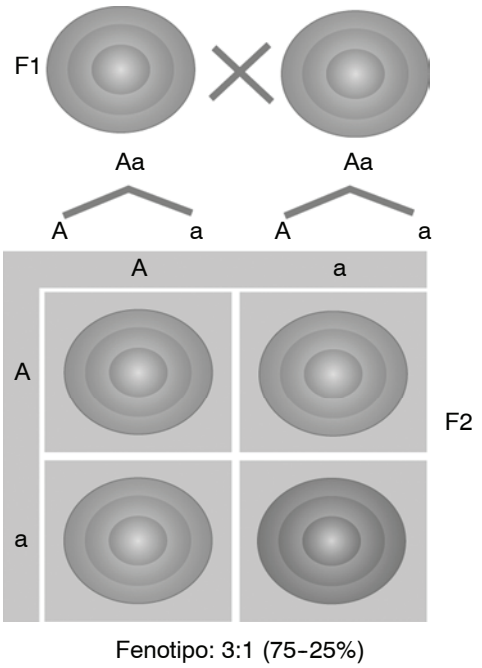


Figura 5-5. Esquema de la segunda ley de Mendel, también conocida como de la separación o disyunción de los alelos, en un tablero de Punnett. Las semillas de la primera generación (F_1) las volvió a cruzar y obtuvo semillas amarillas y verdes en la proporción de 3:1; de esta manera, el alelo que determina la coloración verde de las semillas se manifestó en los nietos o segunda generación (F_2).

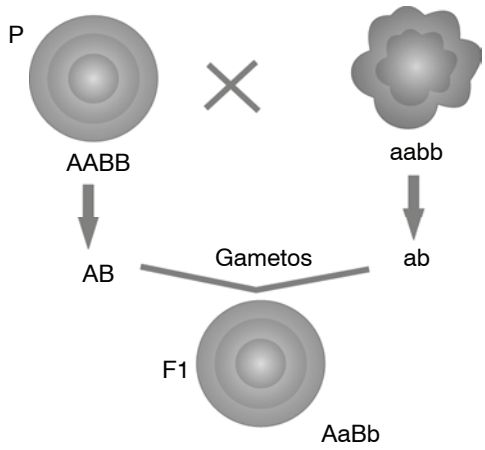


Figura 5-6. Esquema de la tercera ley de Mendel o de la herencia independiente de caracteres. Cuando se cruzan dos caracteres distintos, cada uno de ellos se transmite según las leyes anteriores, independientemente de la presencia del otro carácter. En este experimento, John Gregory Mendel cruzó chícharos de semillas amarillas lisas con semillas verdes rugosas, las dos homocigóticas para estos caracteres. Los chícharos F1 dihíbridos (AaBb) fueron lisos y amarillos, comprobando la primera ley y demostrando también que los caracteres que determinan el color amarillo y la forma lisa son alelos dominantes.

DNA NO CODIFICANTE O EXTRAGÉNICO

Como se mencionó al principio del capítulo, en los organismos superiores, ciertas secuencias de nucleótidos se repiten muchas veces en todo el material genético. Algunas de estas secuencias repetidas representan copias múltiples de genes en tándem que codifican polipéptidos, o de genes que codifican RNA especiales, pero otras secuencias que se repiten no codifican polipéptidos o RNA y su función se desconoce, como los transposones o elementos que se transponen. Estas secuencias son capaces de saltar de una zona a otra de un cromosoma, o de un cromosoma a otro, y pueden originar mutaciones en los genes adyacentes a sus puntos de partida o llegada. El genoma humano nuclear contiene una gran cantidad de familias de secuencias de DNA muy repetidas que son inactivas de manera transcripcional. El DNA repetitivo no codificante muestra dos tipos principales de organización: repetido en tándem y repetido disperso.

DNA no codificante repetido en tándem

Las secuencias del DNA repetidas en tándem consisten en bloques de DNA que no codifican y pueden tener una

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

localización precisa o estar dispersa en el genoma. Este tipo de secuencias se pueden subdividir en tres tipos:

DNA satélite

Comprende cerca de 10 a 15% de las secuencias repetitivas de DNA en el genoma humano. Está constituido por series largas de cientos de kilobases (kb) de repetidos en tándem de 5 a 171 pb. Cuando se fracciona el DNA por sedimentación en un gradiente de densidad, este tipo de secuencias forma bandas satélites con respecto al DNA genómico.

La mayor parte del DNA satélite se localiza en los centrómeros de todos los cromosomas (heterocromatina), por lo cual sugiere una función estructural. Una proporción del DNA satélite se encuentra disperso en el genoma con la función de proteger secuencias codificantes o como amortiguadores de mutación, según la hipótesis salvavidas de Hsu.

Minisatélites o VNTR

Las repeticiones en tándem en número variable (VNTR, del inglés *variable number of tandem repeats*) consisten en dos familias de secuencias cortas de DNA repetidas en tándem: telomérica e hipervariable. La porción terminal de los telómeros de los cromosomas humanos contiene de 10 a 15 kpb de la secuencia hexanucleótida 5‘ TTAGGG3‘, las secuencias repetidas son necesarias para mantener la integridad de los cromosomas durante la replicación y son añadidas por una enzima especializada denominada telomerasa. Además de proteger los extremos de los cromosomas de la degradación y la pérdida de material genético, se relacionan con la función de los telómeros. Este DNA minisatélite se localiza en las regiones subteloméricas, pero también de manera dispersa. Las secuencias son muy polimórficas y se presentan organizadas en más de 1 000 arreglos diferentes que van de 0.1 a 20 Kb de secuencias cortas de 4 a 64 repeticiones en tándem. La unidad de repetición varía mucho; sin embargo, presentan una secuencia central común 5‘GGGCAGGAXG3‘.

La alta variabilidad de estas secuencias es el resultado de errores en la replicación, en donde la polimerasa aumenta o disminuye el número de unidades de repetición; su variabilidad es tan grande que se ha calculado que no existen dos individuos con la misma combinación de alelos minisatélites. Estas propiedades de los minisatélites son la base de los análisis de huella génica del DNA, ya que se puede establecer un perfil de DNA único para cada persona.

Microsatélites

Incluyen bloques pequeños de 150 pb como máximo, de secuencias de 1 a 4 pb repetidas en tándem localizadas 100 000 veces a lo largo del genoma. Los microsatélites pocas veces se encuentran en secuencias codificantes; sin embargo, los repetidos de trinucleótidos que se localizan en o cerca de regiones codificantes de algunos genes se relacionan con ciertas enfermedades hereditarias, como el nucleótido CGG ubicado en el primer exón del gen *FMR1* implicado en el síndrome del cromosoma X frágil.

Los DNA microsatélites también son muy polimórficos y se utilizan para estudios de evolución y huella génica.

Como en el caso de DNA minisatélite, la variación en el número de repetidos cortos de tándem (STR o *short tandem repeats*) se debe a errores cometidos por la DNA polimerasa durante la replicación.

DNA no codificante repetido disperso

Secuencias repetidas

También se pueden encontrar en el genoma humano secuencias de DNA repetido que no están agrupadas en bloques y se encuentran en forma dispersa, y se denominan repetidas dispersas o interespaciadas. De acuerdo con el tamaño de unidad de repetición se dividen en elementos nucleares interespaciados cortos (SINE o *short interspersed nuclear elements*) y elementos nucleares interespaciados largos (LINE o *long interspersed nuclear elements*).

Aún no está clara la función de estas secuencias y se han considerado como elementos genéticos móviles o transposones por tener una capacidad inherente para llevar a cabo un evento de retrotransposición, es decir, que sus transcritos de RNA pueden convertirse en moléculas de cDNA que se pueden reinsertar en diferentes regiones del DNA cromosómico.

Los SINE comprenden casi 10% del genoma humano; la unidad de repetición es de 300 pb, existiendo más de 1 000 000 de copias por genoma.

Las secuencias LINE comprenden de 5 a 12% del genoma humano; la mas común es la secuencia LINE 1 de 200 000 a 500 000 copias de una secuencia de DNA de casi 6.1 kb.

Los elementos SINE y LINE 1 han sido implicados como causas de mutación en enfermedades hereditarias humanas, al proveer al sitio de recombinación homóloga que permite eventos de recombinación anormales.

www.elsolucionario.org

POLIMORFISMO DE UN NUCLEÓTIDO (SNP)

Dentro del genoma humano existen entre alelos homólogos diferencias de una sola base; esta situación se conoce como polimorfismo de un nucleótido (SNP o *single nucleotide polimorphism*), el cual ocurre aproximadamente cada 1 000 pb. Cada SNP tienen dos alelos posibles, por lo que existe una alta probabilidad de que todos los miembros de una familia resulten homocigóticos para un SNP particular, lo cual descarta a los SNP como posibles marcadores para estudios de ligamento génico y mapeo. Pero tienen la ventaja de que son muy abundantes y pueden tipificarse por diferentes metodologías, como electroforesis en gel, secuenciación, PCR en tiempo real con sondas Taqman®, que pueden diferenciar cambios de un solo nucleótido con base en una hibridación de oligonucleótidos muy estricta y en la emisión de fluorescencia.

GENOMA MITOCONDRIAL

Además del núcleo, las mitocondrias y los cloroplastos de las plantas contienen DNA. Estos organelos se autorreproducen por fisión binaria. El DNA se replica de manera similar del núcleo, y algunas veces su código se transcribe y se traduce en proteínas. En 1981 se determinó la secuencia completa de nucleótidos del DNA mitocondrial, el cual utiliza un código que difiere muy poco del utilizado por el núcleo. Los caracteres determinados por el DNA mitocondrial se heredan exclusivamente a través de la madre en el caso de los seres humanos, ya que los espermatozoides sólo transmiten el genoma del núcleo. En este caso se dice que la herencia citoplasmática es exclusiva de la madre. En algunos casos de herencia materna se pueden transmitir también virus de la madre al hijo a través del citoplasma del óvulo. El genoma mitocondrial humano se encuentra definido como una molécula de DNA circular. Las cadenas tienen una composición de bases diferentes: la cadena pesada es rica en guaninas y la ligera en citosina; tienen una zona que se conforma de una triple hélice (DNA tipo Z), y esto se debe a que un segmento corto de la cadena pesada se replica en un segundo tiempo, dando una estructura conocida como DNA7S. Durante la formación del cigoto, el esperma sólo contribuye con su genoma nuclear, en consecuencia el genoma mitocondrial se hereda únicamente por vía materna, y durante la división mitótica las moléculas de DNA lo segregan al azar en las dos células hijas. De acuerdo con el modelo endosimbiótico, el origen de las mitocondrias es el resultado de la simbiosis entre varias células procariotas que fueron fagocitadas por otros procariotas de mayor tamaño. Esta teoría, planteada por Lynn Margulis, se apoya en que las mitocondrias y los cloroplastos contienen moléculas circulares de DNA no relacionadas con histonas, además de varios ribosomas muy similares a los presentes en procariotas como las bacterias.

Genes mitocondriales

El genoma del DNA mitocondrial contiene 37 genes, 28 codificados en la cadena pesada y 9 en la ligera; de éstos, sólo 24 codifican para productos de RNA maduro: 22 moléculas de tRNA mitocondriales y 2 moléculas de rRNA: un rRNA 23S que forma parte de la subunidad grande del ribosoma mitocondrial y un rRNA 16S que forma parte de la unidad pequeña. Los 13 genes restantes codifican para polipéptidos que se sintetizan en los ribosomas mitocondriales. Cada uno de estos 13 polipéptidos codificados por el genoma mitocondrial constituye una subunidad de los complejos respiratorios, la multicadena enzimática para la fosforilación oxidativa y producción de ATP.

El resto de las proteínas mitocondriales se codifican en el genoma nuclear y se traducen en los ribosomas citoplasmáticos, y posteriormente son importados por la mitocondria por translocación.

A diferencia del genoma nuclear, el mitocondrial se encuentra muy compacto, cerca de 93% de sus secuencias son codificadoras, sus 37 genes carecen de intrones, también algunos carecen de codones de terminación. Para compensar esta deficiencia, algunas secuencias UAA son adicionadas postranscripcionalmente. En los genes mitocondriales, a diferencia de los nucleares, la transcripción se inicia en los promotores presentes en el asa D (asa de desplazamiento) y continúa en la dirección opuesta para las dos cadenas, recorriendo el círculo y generando transcritos multigénicos. De manera subsiguiente, los RNA maduros se generan por el corte de los transcritos policistrónicos.

El DNA mitocondrial tiene una tasa de mutación muy alta (10 veces más que el DNA nuclear), ya que es susceptible de sufrir cambios en sus secuencias de nucleótidos, y además existen mecanismos que permiten su fijación rápida, como la incapacidad de su DNA polimerasa de reparar los errores de replicación (mutacio-

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

nes). Se cree que esto ocurre por un mecanismo en cuello de botella, debido a la reducción en el número de mitocondrias en la célula germinal femenina de 100 a 500 y a su proliferación en el ovocito maduro; este mecanismo parece ocasionar la fijación de mutaciones 10 veces más rápida que el genoma nuclear. La divergencia entre los DNA mitocondriales humanos es de 0.57%, con una tasa de acumulación de mutaciones de 2 a 4% cada millón de años, lo cual implica que la divergencia (surgimiento de una nueva especie) ocurra en periodos de 140 000 a 280 000 años. En el caso de los seres humanos, se tuvo la antecesora (Eva mitocondrial) en África hace aproximadamente 200 000 años, lo cual significa que puede surgir una nueva especie humana antes de 100 000 años.

MUTACIONES

El surgimiento de mutaciones cromosómicas espontáneas depende de factores genéticos y ambientales. Las mutaciones son cambios en el DNA de los organismos, ya sea en los genes o en los cromosomas, donde el DNA puede sufrir alteración cualitativa, cuantitativa o redistribución. Aunque la replicación del DNA tiene gran precisión, es imperfecta. Los errores del DNA son muy raros, pero sí se presentan. El DNA hijo contiene uno o más nucleótidos cambiados, lo que se conoce como mutación, la cual puede presentarse en cualquier zona del DNA. Si la mutación se produce en la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido particular, puede alterar la secuencia de aminoácidos y la conformación de la cadena polipeptídica, alterando seriamente las propiedades de la proteína resultante. Un ejemplo de esta situación se presenta en la anemia de células falciformes, donde la hemoglobina de las células falciformes difiere sólo en un aminoácido de la hemoglobina normal. La mayoría de las mutaciones son deletéreas para los seres vivos. Si las mutaciones son muy frecuentes o en gran número, los individuos afectados no se adaptan a su medio y mueren. Sin embargo, ciertas mutaciones son ventajosas, como las que permiten una mejor adaptación al entorno. Éstas se presentan en los casos de microevolución o macroevolución, donde los individuos que tienen la mutación ventajosa se imponen, sobreviven y evolucionan por selección natural respecto a los que no tienen esta ventaja genética. Existen zonas del DNA con 10 o 100 veces más riesgo de experimentar mutaciones; estas zonas que tienen bases alteradas como la 5-metilcitosina se denominan puntos calientes (*hotspot*), porque son especialmente susceptibles a los agentes mutagénicos.

Existen muchos factores causantes de los cambios estructurales en los genes; estos factores se denominan agentes mutagénicos, como las radiaciones UV, los rayos X, etc. Los compuestos carcinogénicos son los responsables de la génesis del cáncer. Cuando las mutaciones se presentan en las células germinales o gametos, pueden transmitirse a la descendencia (son heredables), pero si se presentan en células somáticas y en genes críticos para el crecimiento y desarrollo pueden causar neoplasias como el cáncer. Las mutaciones se consideran variaciones permanentes del material genético y se presentan de dos maneras:

Puntuales

Están limitadas al cambio de una sola base por otra, sin la modificación de la cantidad total del material genético. Si se reemplaza un par de bases por otro, se denominan mutación por sustitución. Las mutaciones puntuales pueden ser de dos tipos según las bases sustituidas:

Transversión

Es poco frecuente, y consiste en la sustitución de una purina por una pirimidina o viceversa, como una G-C por una C-G o por una A-T.

Transición

Es la más frecuente y consiste en la sustitución de una purina por otra purina o una pirimidina por otra pirimidina o viceversa, como una A-T por una G-C. Otro mecanismo de transición se denomina desapareamiento de bases, y se presenta cuando se aparean bases no complementarias por introducción de una base defectuosa como el bromouracilo (BrdU) análogo de la timina con propiedades de apareamiento ambiguas con posibilidad de apareamiento con una adenina o con una guanina.

Longitudinales

En esta modalidad se gana o se pierde material genético, como en el caso de las inserciones, deleciones y duplicaciones. La mutación por supresión intercistrónica ocurre cuando la mutación de un *locus* represor protege de la mutación del gen originalmente mutado. Un cistrón es un fragmento simple de DNA que forma una molécula de RNA o proteína.

www.elsolucionario.org

Clasificación de mutaciones según sus efectos en el individuo

Las mutaciones hacia delante inactivan genes, pero pueden revertirse por mutaciones supresoras, las cuales pueden ser verdaderas si provocan una reversión exacta al estado original (previo a la mutación), o compensatorias, como en el caso de restablecer la función de una proteína que se había inactivado por mutación.

Mudas o silenciosas

Se presentan cuando no tienen ninguna repercusión en la estructura o función de las células. Estas mutaciones afectan al DNA no esencial y su efecto no repercute en la función de los genes.

Somáticas

Estas mutaciones se presentan en células somáticas y, por lo tanto, no se transmiten por herencia a la descendencia, pero pueden causar enfermedades porque pueden afectar la expresión del DNA.

Mutaciones gaméticas

Estas mutaciones se presentan en las células germinales. Son muy trascendentes, ya que modifican para siempre el genoma de la descendencia y se manifiestan en la próxima generación o generación hija. Este tipo de mutaciones son la base de la evolución, pero también de las enfermedades genéticas hereditarias.

El botánico alemán Hugo de Vries, uno de los redescubridores de Mendel, fue el primero en describir las mutaciones en 1901. Generalmente las mutaciones son recesivas porque sus efectos perjudiciales no se expresan a menos que coincidan en los dos alelos para dar lugar a una situación homocigótica, como en la procreación consanguínea, donde el apareamiento de organismos muy relacionados puede haber heredado el mismo gen mutante recesivo de un antecesor común. Ésta es la explicación de la mayor frecuencia que presentan las enfermedades hereditarias entre ciertos grupos humanos que se casan entre ellos, como los judíos, que en el resto de la población.

En los seres humanos existe una fuerte correlación entre la acumulación de mutaciones y el desarrollo de cáncer. En el genoma humano se presentan varios miles de mutaciones durante un lapso de 24 h, pero debido a la efectiva reparación del DNA, éstas son eliminadas. Se considera que la tasa de mutaciones en el ser humano se presenta en 1 de cada 1 000 lesiones del DNA. Aunque el DNA es una molécula muy estable, si no existieran los sistemas tan efectivos de reparación, el efecto aditivo de sus lesiones haría que la vida humana fuera imposible.

REPARACIÓN DEL DNA

Las DNA polimerasas son muy precisas, ya que poseen actividad exonucleasa 5' a 3' separada, para eliminar los nucleótidos insertados de manera incorrecta por cada 10^4 a 10^5 nucleótidos incorporados. A esta función de la enzima se la conoce como corrección de pruebas, ya que comprueba que los nucleótidos sean los que corresponden, y de no ser así no se puede continuar con la polimerización hasta que se proceda a la reparación correspondiente. Además de la DNA polimerasa I, en eucariotas existen otras enzimas que reparan los pares de bases incorrectos que se han formado durante la replicación. Los mecanismos múltiples de reparación incluyen enzimas que revierten la modificación química de manera directa, enzimas que reparan el DNA por medio de cortes de nucleótidos y enzimas glicosilasas de DNA que remueven las bases alteradas.

1. **Enzimas que revierten el daño de manera directa.** Entre estas enzimas se encuentran las DNA fotoliasas, que reparan los dímeros de pirimidina a sus estados monoméricos mediante la absorción de luz. La enzima O^6-metilguanina es una enzima que causa mutaciones porque incorpora timina en vez de guanina en la replicación, pero la enzima O^6-metilguanina-DNA metiltransferasa transfiere el grupo metilo de la O^6-metilguanina a uno de sus residuos cisteína, regresando la guanina a su estado original.
2. **Enzimas glicosilasas de DNA.** Estas enzimas remueven las bases alteradas por una actividad endonucleasa con posterior reemplazo de bases normales por acción de las enzimas DNA polimerasa I y ligasa.
3. **Reparación del DNA por medio de cortes de nucleótidos.** En este mecanismo de reparación por corte de nucleótidos (en inglés, NER), la región del DNA que tiene la secuencia alterada es cortada y eliminada por la enzima endonucleasa UvrABC dependiente de ATP. Posteriormente se vuelve a polimerizar la hebra cortada por acción de la DNA polimerasa con un sellado final por la enzima DNA ligasa (figura 5-7). La enfermedad xeroderma *pigmentosum*, que se presenta por

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

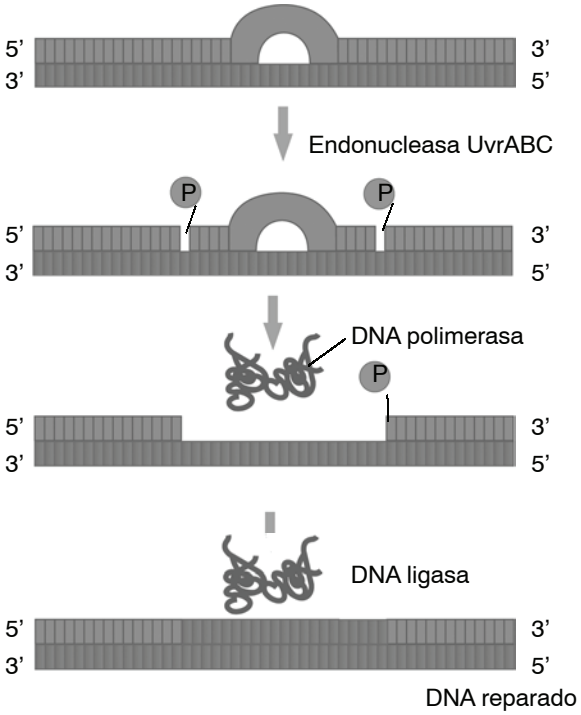


Figura 5-7. Esquema de la reparación del DNA mediante el sistema NER. En este mecanismo de eliminación de bases alteradas y reemplazo por bases normales se involucran cerca de 16 proteínas en un segmento de 25 y 35 pb. El ejemplo que se muestra en la figura es la remoción de los dímeros de timina causados por radiación UV.

una deficiencia en la reparación de las mutaciones causadas por radiación UV, es autosómica recesiva y se debe a que el sistema NER se encuentra alterado.

CARIOTIPO

Es el complemento cromosómico de un individuo respecto a forma, tamaño y número de cromosomas, que se obtiene a partir de la microfotografía de una célula somática en metafase. Existe una convención internacional para comparar el conjunto de pares cromosómicos de una célula durante la metafase, identificando los pares homólogos y disponiendo los pares de cromosomas en filas. Cada especie tiene su propio cariotipo que la identifica. En el caso del ser humano, se numeran del 1 al 22 o se separan por grupos (A-G) y al final los pares de cromosomas sexuales. En 1978, una comisión internacional permanente publicó *An International System for Human Cytogenetic Nomenclature* (ISCN). Este código es universal y describe el cariotipo normal y anormal.

Las técnicas de marcado cromosómico que surgieron en 1971 permitieron estudiar la topografía cromosómica en forma de bandas alternantes claras y oscuras que aparecen siempre constantes en los brazos cromosómicos, lo que permite su identificación precisa, así como detectar cualquier alteración como adiciones, no disyunciones y deleciones. En la actualidad se puede realizar el diagnóstico cromosómico prenatal mediante amniocentesis o por biopsia de vellosidades coriónicas.

También se pueden estudiar los cromosomas en el periodo *post mortem* inmediato, por cultivo de tenocitos (células del tendón de Aquiles). En estos estudios se estimula la división celular por medio de fitohemaglutinina. Después de dos a tres días de cultivo, la división se detiene en metafase agregando colchicina para poder visualizar los cromosomas en metafase con sus dos cromátides unidas por el centrómero.

Determinación del sexo

En el ser humano, el cromosoma Y determina el sexo, ya que su ausencia o inactivación induce el desarrollo sexual femenino. El gen Sry, ubicado en el cromosoma Y, es el principal determinante del sexo masculino, ya que ejerce efecto regulador sobre los demás genes que favorecen el desarrollo sexual masculino. Su ausencia o inactivación, aun con el cromosoma Y presente, induce el desarrollo sexual femenino.

Cromatina sexual

El corpúsculo de Barr o cromatina sexual, un pequeño grumo redondeado y basófilo, se puede identificar para descubrir el sexo cromosómico de un feto, ya que corresponde a un cromosoma X reprimido en interfase bajo la forma de palillo de tambor (figura 5-8). Esta heterocromatina muy condensada se presenta cuando existen dos cromosomas X, como en las mujeres y en los varones con síndrome de Klinefelter con fórmula cromosómica 47, XXY.

ANOMALÍAS CROMOSÓMICAS

Las anomalías cromosómicas se refieren a desviaciones de lo estándar, e incluyen variaciones en la cantidad y estructura o respecto a un cariotipo normal.

www.elsolucionario.org

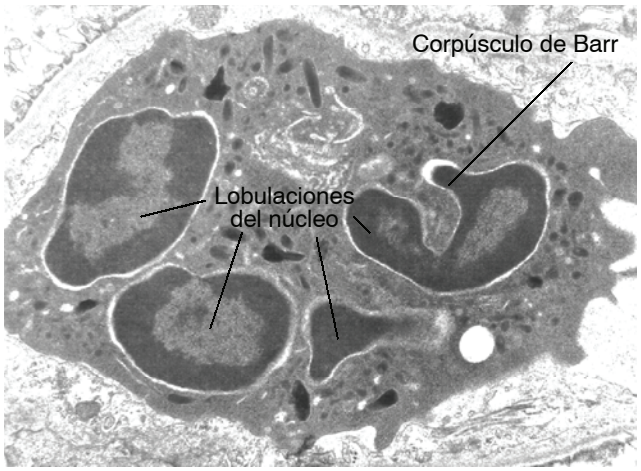


Figura 5-8. Fotografía de un neutrófilo en contacto con el endotelio glomerular. Se observa su núcleo lobulado donde se localiza el corpúsculo de Barr en las mujeres (cromosoma X inactivado). Su citoplasma presenta gran cantidad de gránulos pequeños. MET 10 000 X.

Variaciones en la cantidad de cromosomas

Aneuploidía

El número de cromosomas no es múltiplo exacto del número haploide; se presenta cuando se produce la no disyunción durante la división celular. Las alteraciones aneuploides más frecuentes son las monosomías y trisomías.

Poliploidía

Las células poliploides contienen un número múltiplo del número haploide. En el caso del ser humano, donde el número haploide (n) es de 23 cromosomas y el diploide (2n) es de 46 cromosomas, las células poliploides pueden contener triploidía 3n o 69 cromosomas, tetraploidía de 92 cromosomas, etc. La poliploidía es el único proceso identificado por medio del cual puede surgir una nueva especie en una generación única. Se han detectado organismos poliploides viables y fértiles en ciertas plantas con flores y algunos invertebrados hermafroditas. Por lo general, la nueva planta poliploide es más grande y más robusta que su predecesora diploide. Si la poliploidía se origina en fetos humanos, éstos fallecen por ser inviables o incompatibles con la vida, y se produce el aborto, generalmente en las fases iniciales de la gestación.

Variaciones en la estructura cromosómica

Translocación

Se presenta cuando el fragmento separado se une a un cromosoma o fragmento diferente del cromosoma original. Puede ser de dos tipos:

- **Translocación recíproca.** En esta alteración se intercambian segmentos entre cromosomas no homólogos.
- **Translocación simple.** En esta alteración, un segmento de un cromosoma se transfiere a otro cromosoma.

Deleción

Es la ausencia anormal de un segmento de un cromosoma, por eliminación de un segmento del cromosoma o de millones de pb.

Duplicación

En esta alteración se pierde un fragmento de un cromosoma y a su vez este fragmento es adquirido por otro, de tal manera que un cromosoma presenta una deleción y el otro una duplicación.

Inserción

En este tipo de alteración se adiciona un segmento de cromosoma.

Inversión

En este tipo de anomalía, una región del cromosoma se puede separar, invertir y unirse de nuevo al cromosoma en el mismo lugar.

ENFERMEDADES GENÉTICAS

Se dice que casi todas las enfermedades humanas son genéticas debido a que los genes desempeñan funciones muy variadas y participan de manera directa o indirecta en la génesis de la enfermedad.

Los seres humanos somos portadores de diferentes alelos mutados que son autosómicos recesivos (AR) y

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

que no se manifiestan fenotípicamente, pero que genotípicamente están presentes. Nosotros heredamos de nuestros progenitores alelos que se conjuntan para formar nuestro genoma. Existen los genes que se localizan en los cromosomas autonómicos y los que se localizan en los cromosomas sexuales; por esa razón se dice que existen enfermedades autosómicas que pueden ser recesivas (es necesario que se agrupen los dos alelos mutados homocigóticos para manifestar la enfermedad) o enfermedades autosómicas dominantes (AD) (con heredar un alelo mutado, heterocigoto, se puede manifestar la enfermedad).

Para el grupo de alteraciones ligadas al sexo o a los cromosomas sexuales existen enfermedades cuyos genes se localizan en el cromosoma X.

Si un varón hereda un alelo mutado del cromosoma X materno manifiesta la enfermedad aunque sea un alelo recesivo; esto se debe al hecho de tener tan sólo un cromosoma X.

No así las mujeres que heredan un alelo alterado, pues poseen otro cromosoma X cuyo alelo normal complementa la función.

Existen cinco patrones básicos de herencia de un solo gen:

1. Autosómico dominante.
2. Autosómico recesivo.
3. Dominante ligado al cromosoma X.
4. Recesivo ligado al cromosoma X.
5. Herencia materna (mitocondrial).

EJEMPLOS DE TRASTORNOS DE UN SOLO GEN

Autosómico dominante

Neurofibromatosis generalizada tipo 1 o enfermedad de von Recklinghausen

Es una facomatosis o displasia neuroectodérmica con lesiones en piel y en el sistema nervioso central. Se desarrollan tumores benignos en las vainas periféricas de los nervios, que se observan como manchas color café con leche. Se debe a la mutación del gen NF1 que codifica la síntesis de neurofibromina, una proteína de las vainas nerviosas que participa en la activación de enzimas guanosintrifosfatasas necesarias para la regulación de los programas de señalización que controlan el crecimiento celular de los nervios periféricos.

Hipercolesterolemia familiar, hiperlipoproteinemia tipo II o xantomatosis hipercolesterolémica

Esta enfermedad se debe a la mutación en el gen receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDL). La enfermedad heterocigótica afecta a 1 de cada 500 personas. El gen afectado codifica para una proteína que interviene en la captación del colesterol, el cual se transporta por la sangre por una LDL, la que no puede ingresar a las células y se acumula en la sangre, incrementando el riesgo de desarrollar aterosclerosis y cardiopatías.

La enfermedad homocigótica afecta a una en cada millón de personas; estos pacientes desarrollan enfermedades cardiacas en la niñez.

Enfermedad poliquística del riñón (ERP)

En esta enfermedad los riñones forman sacos llenos de líquido llamados quistes, los cuales pueden dañar los riñones debido a que pueden infectarse. La ERP es la causa más común de enfermedad hereditaria en EUA. Es la cuarta causa de insuficiencia renal y afecta a casi 500 000 personas en ese país. Existen dos formas primarias hereditarias de ERP y una forma no hereditaria.

a. **ERP autosómica dominante.** Representa aproximadamente 90% de todos los casos.
b. **ERP autosómica recesiva.** Se debe a un defecto genético particular, diferente del defecto genético que causa la ERP autosómica dominante.
c. **Enfermedad quística del riñón adquirida.** Esta enfermedad se puede desarrollar en pacientes con insuficiencia renal y que han estado en tratamiento de diálisis.

Enfermedad de Huntington o corea de Huntington

Esta enfermedad neurodegenerativa aparece a los 30 años de edad y afecta los ganglios basales. Los pacientes desarrollan alteraciones cognoscitivas, psiquiátricas y motoras. El defecto genético se localiza en el cromosoma 4 en la región 4p16, 3.

Autosómico recesivo

Fibrosis quística (mucoviscidosis)

Afecta 1 de cada 2 000 personas caucásicas. La enfermedad se presenta por deficiencia en una proteína cuyo

www.elsolucionario.org

gen se localiza en el brazo largo del cromosoma 7-7q31.1. Esta deficiencia en la proteína transportadora de iones cloruro a las células ocasiona la acumulación de un moco espeso en pulmones principalmente, comprometiendo la respiración y aumentando la probabilidad de adquirir infecciones pulmonares. Las personas mueren en promedio a los 40 años de edad. También afecta las glándulas sudoríparas y el tubo digestivo. La enfermedad puede ser diagnosticada debido a la gran concentración de sal (NaCl) en el sudor.

Fenilcetonuria

Afecta 1 de cada 12 000 nacimientos. La enfermedad se presenta por la deficiencia de una enzima necesaria en el metabolismo del aminoácido fenilalanina. Se manifiesta principalmente por retardo mental

Deficiencia de alfa-1-antitripsina (AAT)

Esta enfermedad se presenta en 1 de cada 10 000 nacimientos. Los pacientes desarrollan enfisema debido a la función anormal o deficiencia de la AAT, por lo que se genera autólisis debido a enzimas liberadas por los leucocitos.

Anemia drepanocítica

Su incidencia es alta en personas afroamericanas. Los pacientes heterocigotos son resistentes a la malaria, mientras que los homocigotos contienen una hemoglobina anormal, lo que ocasiona que los eritrocitos adquieran formas anormales y se destruyan.

Deficiencia de adenosina deaminasa

Este raro trastorno de inmunodeficiencia también se conoce como "enfermedad del niño en una burbuja", ya que el funcionamiento de los linfocitos es anormal, lo que afecta a la respuesta inmunitaria específica.

Dominante ligado al cromosoma X

Raquitismo hipofosfatémico

También se conoce como raquitismo resistente a la vitamina D. El defecto ocurre en una proteína renal que no puede trasportar el fosfato desde el filtrado urinario hasta la sangre. Esta hipofosfatemia estimula la secreción de hormona paratiroidea, la cual induce la liberación de calcio y fosfato permanentemente de los huesos, lo que ocasiona huesos anormales y frágiles.

Daltonismo

El daltonismo, o ceguera a los colores, se debe a un defecto en una de las tres células sensibles a los colores de la retina, causado por un gen mutante. La acromatopsia o monocromatismo es la ceguera completa para los colores. En el discromatismo, o ceguera parcial para los colores, existe incapacidad para diferenciar o para percibir el rojo y el verde. Existen tres tipos de pacientes con discromatopsias:

a. **Protanopes.** No ven el color rojo y lo confunden con el verde, pero distinguen los demás colores.
b. **Deuteranopes o daltónicos.** No ven el color verde y lo confunden con el rojo.
c. **Tritanopes.** Es muy raro, consiste en confundir el amarillo y el azul.

Síndrome X frágil o síndrome de Martin y Bell

Es la primera causa hereditaria de retraso mental. La enfermedad se debe a un defecto en el gen FMR1. El defecto en este gen es una repetición del trinucleótido CGGn (triplete **c**itosina-**g**uanina-**g**uanina). Cuando este trinucleótido se repite más de 200 veces, se inhibe la expresión del gen. La ubicación del gen FMR1 se localiza en el cromosoma X, en la posición 27.3 del brazo largo (q), el *locus* citogenético es Xq27.3.

Recesivo ligado al cromosoma X

Distrofia muscular de Duchenne

Esta enfermedad se presenta en 1 de cada 3 500 varones. Los músculos se deterioran gradualmente hasta que se afecta el mecanismo de ventilación pulmonar. Estos pacientes mueren de infecciones pulmonares antes de llegar a los 20 años de edad.

Hemofilia A

Esta enfermedad afecta a 1 de cada 10 000 varones. El factor VIII de coagulación es defectuoso y las personas afectadas necesitan inyecciones de la proteína o transfusiones sanguíneas para evitar hemorragias masivas.

Trastornos mitocondriales ligados al DNA

Las mitocondrias son organelos que contienen DNA propio (mtDNA). Más de 20 trastornos hereditarios se deben a mutaciones en el DNA mitocondrial. Debido a

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

Cuadro 5-3. Comparación entre la herencia autosómica dominante y la autosómica recesiva

Autosómica dominante	Autosómica recesiva
Se expresa en heterocigotos	Se expresa en homocigotos
Riesgo en cada embarazo 50%	Riesgo en cada embarazo 25%
Expresividad variable	Expresividad constante
Pedigree vertical	Pedigree horizontal
Varias generaciones afectadas	

que las mitocondrias provienen sólo del óvulo, su herencia es exclusivamente materna y los hombres afectados no pasan la enfermedad a sus hijos. Estas enfermedades se caracterizan por ceguera, alteraciones metabólicas, retraso psicomotor, hipoacusia, baja estatura, etc. Las mutaciones más estudiadas son las siguientes:

Neuropatía hereditaria de Leber

Se debe a múltiples mutaciones en los genes que codifican el complejo I (NADH-deshidrogenasa).

Miopatía mitocondrial con encefalopatía, acidosis láctica y episodios similares al ictus (MELAS)

Esta enfermedad se debe a una disfunción del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial debida a un cambio de bases en el par 3 243 de la cadena pesada.

Neuropatía, ataxia, retinitis pigmentaria

Esta mutación se localiza en el gen que codifica el complejo V de la cadena respiratoria (ATP-asa 6).

Epilepsia mioclónica, fibras rojas deshilachadas

Esta enfermedad se debe a una mutación del gen que codifica el tRNA de la lisina por un cambio de bases en la posición 8 344 de la cadena pesada. Esta mutación también produce una disfunción del complejo V de la cadena respiratoria.

TRASTORNOS CROMOSÓMICOS

En los trastornos cromosómicos el defecto es ocasionado por un exceso o deficiencia de los genes que existen en un cromosoma.

Un ejemplo clásico es la trisomía 21 o síndrome de Down, ya que es el trastorno cromosómico más común y se presenta en 1 de cada 800 personas.

Estos pacientes tienen una copia extra del cromosoma 21 (trisomía); se caracterizan por retardo mental de moderado a grave y un fenotipo mongoloide característico.

TRASTORNOS MULTIFACTORIALES

Estas enfermedades son las más comunes, como hipertensión arterial y algunos cánceres. La causa se debe a numerosos genes afectados y a factores externos como la dieta, contaminación, exposición ambiental a agentes tóxicos, etc.

www.elsolucionario.org

Capítulo 6

Nacimiento celular. Ciclo celular

Dolores Javier Sánchez González, Dairo Jesús Orjuela Henry,
Luis Humberto Pérez Astudillo, Nayeli Isabel Trejo Bahena

INTRODUCCIÓN

Las células eucariotas pasan a través de una secuencia regular de crecimiento y división llamada ciclo celular, el cual es la secuencia cíclica y ordenada de procesos en los que la célula crece y se divide en dos células hijas. Consiste en interfase, mitosis y citocinesis. El lapso de tiempo requerido para completar un ciclo celular es el tiempo de regeneración. Las células que no se están dividiendo no ingresan al ciclo celular, sino que están fuera, en fase G_0 (del inglés *gap,* intervalo). La duración del ciclo celular varía según la estirpe celular, siendo la duración media del ciclo completo de unas 24 h. El ciclo celular se divide en cuatro fases o cuatro estados metabólicos distintos; estas fases se denominan G_1, S, G_2 (interfase) y M (mitosis). La mitosis, periodo de división o fase M, puede durar desde pocas horas hasta varios días, dependiendo del tipo de célula y de factores externos como la temperatura o los nutrimentos disponibles; se divide a su vez en dos sucesos:

1. **Mitosis o división nuclear (cariocinesis).** Es la división celular en que una célula progenitora se divide en dos células hijas idénticas. Esta fase se divide en profase, metafase, anafase y telofase. En la mitosis se visualizan los cromosomas al microscopio al ser paralizados con colchicina y tiene una duración promedio de 1 h.
2. **Citocinesis o división citoplasmática para generar dos células hijas.** Generalmente, pero no siempre, la citocinesis acompaña a la mitosis en una secuencia coordinada de procesos.

En el desarrollo y mantenimiento de la estructura de los organismos pluricelulares no sólo se requiere la división celular, que aumenta el número de células somáticas, sino también el proceso de apoptosis.

La apoptosis es un proceso de muerte celular programada. En los vertebrados, se regula el número de neuronas durante el desarrollo del sistema nervioso por medio de apoptosis; también se eliminan linfocitos que no realizan correctamente su función y moldea las formas de órganos en desarrollo. Eventualmente, las células escapan a los controles normales de división y muerte celular. Cuando una célula comienza a proliferar de modo descontrolado, se desarrolla el cáncer. Esta proliferación celular progresiva puede dar lugar a la formación de una masa de células, denominada tumor, cuyo crecimiento también depende de la evasión de la apoptosis.

A excepción de los gametos (del griego *gametes,* esposo, y *gamete,* esposa), cada célula somática de un individuo posee un número idéntico de cromosomas (46 sencillos o 23 pares en el ser humano). Un miembro del par proviene de cada progenitor. Cada miembro del par se denomina homólogo; así, el ser humano tiene 23 pares de homólogos. El número original de cromosomas de una célula se denomina número diploide (del griego *di,* doble, y *ploos,* pliegue). La continuidad del número cromosómico de una especie es mantenida por la mitosis. Las moléculas y estructuras citoplasmáticas aumentan en número; en la fase S, los cromosomas se duplican; en la fase G_2 comienza la condensación de los cromosomas y el ensamblado de las estructuras especiales requeridas para la mitosis y la citocinesis. Durante la mitosis, los cromosomas duplicados son distribuidos entre los dos núcleos hijos, y en la citocinesis, el citoplasma se divide, separando la célula materna en dos células hijas.

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

El ciclo celular está finamente regulado. Esta regulación ocurre en distintos momentos y puede involucrar la interacción de diversos factores, entre ellos la falta de nutrimentos, y los cambios en temperatura o en pH pueden hacer que las células detengan su crecimiento y su división. Cuando las células normales cesan su crecimiento por diversos factores, se detienen en un punto tardío de la fase G_1, denominado punto de restricción R, o primer punto de control del ciclo celular. En algunos casos, antes de alcanzar el punto R, las células pasan de la fase G_1 a un estado especial de reposo, llamado G_0, en el cual pueden permanecer durante días, semanas o años. Una vez que las células sobrepasan el punto R, siguen necesariamente a través del resto de las fases del ciclo, y luego se dividen. Factores ambientales, como cambios en la temperatura y el pH, o disminución de los niveles de nutrientes, llevan a la disminución de la velocidad de división celular (figura 6-1).

La fase G_1 se completa rápidamente y, en la fase S, comienza la síntesis de DNA y de histonas. Existe otro mecanismo de control durante el proceso de duplicación del material genético. Es la fase S, que asegura que la duplicación ocurra una sola vez por ciclo. Luego, la célula entra en la fase G_2 del ciclo. En G_2 existe un segundo punto de control en el cual la célula evalúa si está preparada para entrar en mitosis. Este control actúa como un mecanismo de seguridad que garantiza que solamente entren en mitosis aquellas células que hayan completado la duplicación de su material genético. El pasaje de la célula a través del punto R depende de la integración del conjunto de señales externas e internas que recibe. El sistema de control del ciclo celular está basado en dos proteínas clave, las ciclinas y las proteínas cinasas dependientes de ciclinas (CDC), que responden a esta integración de señales. Cuando la célula recibe las señales adecuadas para dividirse, entra al estado metabólico G_1 (fase G_1). Antes se creía que era una fase de reposo, al igual que todas las que tienen la letra G; pero es uno de los momentos del ciclo en que se producen los eventos más importantes para la división celular, ya que la célula se prepara para iniciarla.

Los cromosomas son el material genético, se encuentran organizados en secuencias de nucleótidos llamadas genes, los cuales tienen la información indispensable para el funcionamiento de las células y del organismo en general. Las células se reproducen mediante el proceso denominado división celular, cuyo material genético (DNA) se hereda por igual a las dos células hijas. En los organismos unicelulares, por este mecanismo aumenta el número de individuos en la población. En las plantas y en los animales multicelulares, la división celular es el procedimiento por el cual el organismo crece a partir de una sola célula, y los tejidos alterados son reemplazados y reparados. Cuando una célula alcanza cierto tamaño crítico y cierto estado metabólico, se divide en dos células hijas (figura 6-2).

DIVISIÓN CELULAR EN PROCARIOTAS

Por medio de la división celular, el DNA de una célula se reparte entre dos nuevas células hijas. La distribución de duplicados exactos de la información hereditaria es

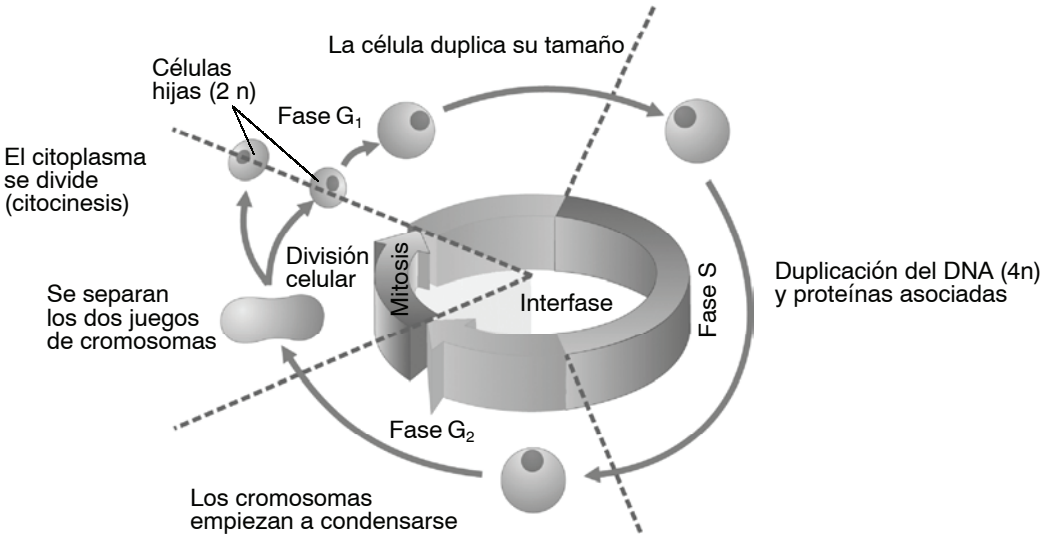


Figura 6-1. Esquema del ciclo celular. La división celular se compone de la mitosis o división del núcleo, y la citocinesis o división del citoplasma. La mitosis ocurre después de completarse las tres fases preparatorias que constituyen la interfase: fase G_1, S y G_2.

www.elsolucionario.org

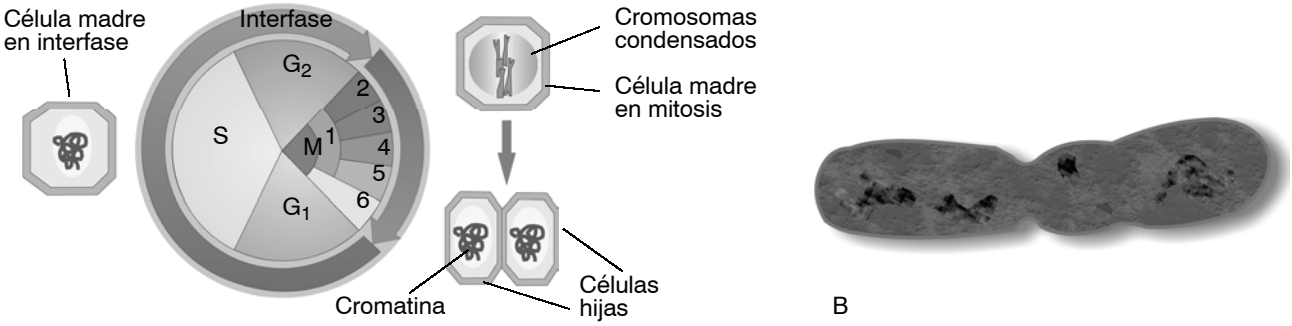


Figura 6–2. ***A.*** En la interfase, los cromosomas son visibles dentro del núcleo sólo como delgadas hebras de material filamentoso llamado cromatina. Por medio del proceso de mitosis, los cromosomas se distribuyen de manera que cada nueva célula obtiene la mitad del material genético (2n). Cuando comienza la mitosis, los cromosomas condensados, que ya se duplicaron durante la interfase, se hacen visibles bajo el microscopio óptico. Finalmente, la división celular mitósica produce dos células hijas genéticamente idénticas a la célula original. ***1.*** Mitosis. ***2.*** Profase. ***3.*** Metafase. ***4.*** Anafase. ***5.*** Telofase. ***6.*** Citocinesis. ***B.*** Fisión binaria en bacterias y mitocondrias: este mecanismo de reproducción celular es asexual, y se muestra una bacteria dividiéndose por la mitad (citocinesis).

relativamente simple en las células procariotas, en donde la mayor parte del material genético está en forma de una sola molécula larga y circular de DNA, a la que se asocian ciertas proteínas específicas. Esta molécula constituye el cromosoma de la célula y se duplica antes de la división celular. Cada uno de los dos cromosomas hijos se ancla a la membrana celular en polos opuestos de la célula. Cuando la célula se alarga, los cromosomas se separan. Cuando la célula alcanza aproximadamente el doble de su tamaño original y los cromosomas están separados, la membrana celular se invagina y se forma una nueva frontera, que separa a las dos células nuevas y a sus duplicados cromosómicos.

DIVISIÓN CELULAR EN EUCARIOTAS

Este método asexual de reproducción ocurre en bacterias donde todos los organismos de una colonia son genéticamente iguales. En las infecciones bacterianas, los antibióticos que matan a una bacteria matarán a todos los miembros del clon o colonia. El cromosoma único procariota es una sola molécula circular de DNA contenida en una región definida del citoplasma, denominada nucleoide. Este cromosoma compone el genoma por sí solo, aunque eventualmente se encuentran unidades de replicación autónomas, denominadas plásmidos, que no son indispensables para la vida de las bacterias.

La duplicación de las células procariotas se denomina fisión binaria (figura 6–2). Esta duplicación de la célula va precedida de la replicación del cromosoma bacteriano. Primero se replica y luego se pega cada copia a una parte diferente de la membrana celular. Cuando las células que se originan comienzan a separarse, también se separa el cromosoma original del replicado (este mecanismo de división es similar en las mitocondrias). Después de la separación, o citocinesis, se forman dos células hijas de idéntica composición genética.

En las células eucariotas, la división exacta del material genético es mucho más compleja que en las procariotas. Una célula eucariota típica contiene aproximadamente 1 000 veces más DNA que una célula procariota; este DNA es lineal y forma un cierto número de cromosomas diferentes. Cuando estas células se dividen, cada célula hija tiene que recibir una copia completa, y sólo una, de cada uno de los 46 cromosomas en el caso del ser humano. Además, las células eucariotas contienen una variedad de organelos que también deben ser repartidos entre las células hijas. Durante la mitosis se forma el huso de microtúbulos, al cual se une, en forma independiente, cada uno de los cromosomas presentes en la célula. Esta estructura permite que los cromosomas se separen unos de otros en forma organizada. La mitosis por lo general va seguida de un proceso de citocinesis que divide a la célula en dos células nuevas. Cada una contiene no sólo un núcleo con un complemento de cromosomas completo, sino también, aproximadamente, la mitad del citoplasma, incluyendo los organelos y muchas macromoléculas de la célula madre.

INTERFASE

Es el periodo durante el cual la célula crece, replica su DNA y se prepara para la siguiente división. Este perio-

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

do está comprendido entre divisiones celulares y es la fase más larga del ciclo celular, ocupando casi 95% del ciclo. Consta de tres fases (G_1, S y G_2) dentro del ciclo celular y una fase (G_0) en estado quiescente o de reposo.

Fase o intervalo G_1 *(gap* 1)

La G es por *gap:* intervalo. Es la primera fase del ciclo celular en la que existe crecimiento celular con síntesis de proteínas y de RNA. En esta fase tienen lugar las actividades de la célula: secreción, conducción, endocitosis, etc. Comenzando a partir de la citocinesis de la división anterior, la célula hija resulta pequeña y posee un bajo contenido de ATP resultante del gasto efectuado en el ciclo anterior, por lo que en este periodo se produce la acumulación del ATP necesario y el incremento de tamaño celular.

La fase G_1 es el periodo que transcurre entre el fin de una mitosis y el inicio de la síntesis de DNA. Tiene una duración de entre 6 y 12 h, y durante este tiempo la célula dobla su tamaño y masa debido a la continua síntesis de todos sus componentes como resultado de la expresión de los genes que codifican las proteínas responsables de su fenotipo particular. Es el periodo que más variación de tiempo presenta, pudiendo durar días, meses o años. En esta fase, la célula es diploide o 2n. Las células que no se dividen nuevamente (como las neuronas o las del músculo esquelético) pasan toda su vida en este periodo, que en estos casos se denomina G_0.

Intervalo S o fase S

Es la fase de síntesis o replicación del DNA, y corresponde a la segunda fase del ciclo celular. Comienza cuando la célula adquiere el tamaño suficiente y el ATP necesario. Con la duplicación del DNA, el núcleo contiene el doble de proteínas nucleares y de DNA que al principio de la división celular tenía. Tiene una duración promedio de seis a ocho horas.

Fase G_2

Es el tiempo que transcurre entre la duplicación del DNA y el inicio de la mitosis. Dado que el proceso de síntesis consume una gran cantidad de energía, la célula entra nuevamente en un proceso de crecimiento y adquisición de ATP que proporcionará energía durante el proceso de mitosis. En esta fase continúa la duplicación de proteínas y RNA, y el contenido de DNA es tetraploide o 4n. Si se observa al microscopio, se perciben cambios en la estructura celular que indican el principio de la división celular. Tiene una duración de entre 3 y 4 horas.

Los organismos multicelulares se derivan de una sola célula o cigoto. Las divisiones múltiples de ésta y sus descendientes determinan la formación, desarrollo y crecimiento del individuo. Sin embargo, en organismos unicelulares, la división celular es en realidad una verdadera reproducción, ya que por este proceso se producen dos células hijas idénticas a la célula progenitora (figura 6-3).

MITOSIS

La mitosis es el proceso de segregación de cromosomas y división de las células somáticas eucariotas (células no germinales), que conllevan a la copia y reproducción del material genético. Este proceso asegura que cada célula que nace de otra tenga los mismos datos genéticos de la célula madre. La mitosis cumple la función de distribuir los cromosomas duplicados de tal modo que cada nueva célula obtenga una dotación completa, y similar de cromosomas a la célula progenitora y a su célula her-

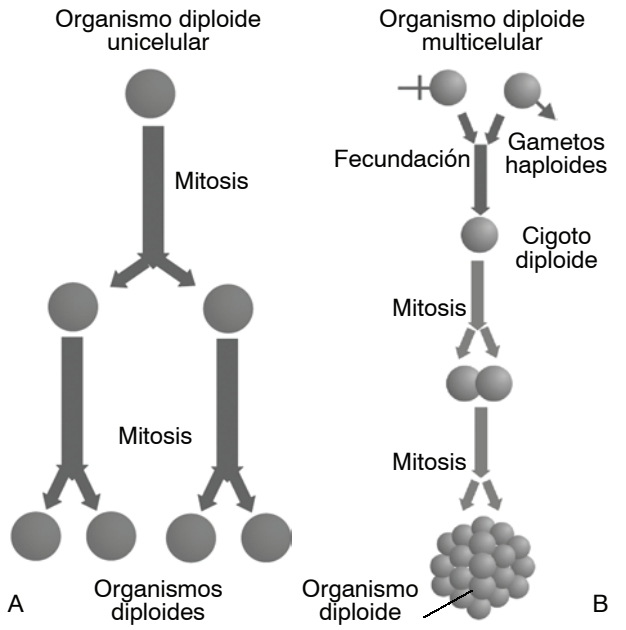


Figura 6-3. Esquema de la división celular. ***A.*** Organismos unicelulares. La división celular es una verdadera reproducción, ya que por este mecanismo se producen dos células hijas. ***B.*** Organismos multicelulares. Éstos derivan de una sola célula o cigoto, la cual da origen al organismo completo, por medio de divisiones múltiples y repetidas.

www.elsolucionario.org

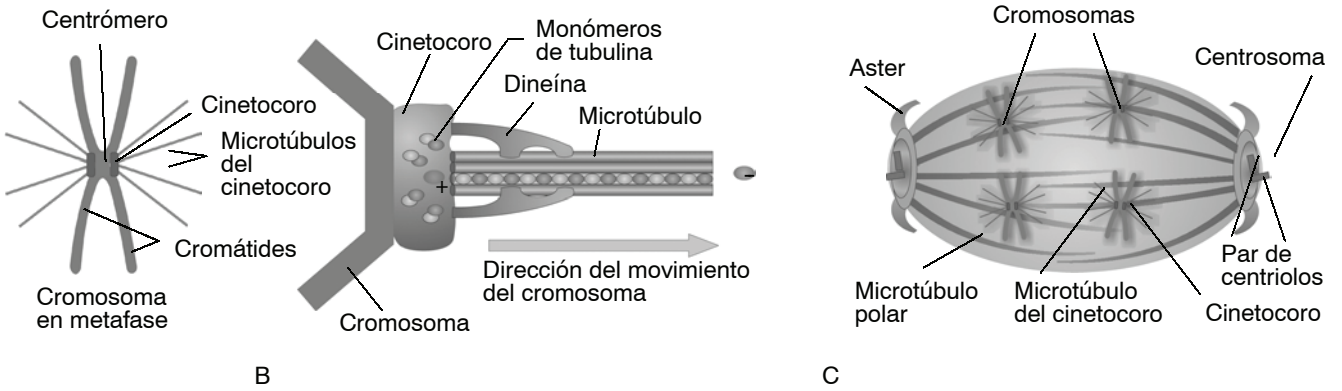


Figura 6–4. ***A.*** Ubicación de los cinetocoros en el centrómero de un cromosoma en metafase. Se observan los microtúbulos del cinetocoro. ***B.*** Detalle de los cinetocoros y de la dirección de los movimientos que experimentan los cromosomas en metafase para alinearse en el plano ecuatorial. Los microtúbulos se fijan al cinetocoro mediante dineínas. ***C.*** Huso mitótico.

mana. La capacidad de la célula para llevar a cabo esta distribución depende del estado condensado de los cromosomas durante la mitosis y del ensamble de microtúbulos, denominado huso mitótico.

En los estadios tempranos de la mitosis, cada uno de los cromosomas consiste en dos copias idénticas, llamadas cromátides, que se mantienen juntas por sus centrómeros.

Al mismo tiempo se organiza el huso, cuya formación se inicia a partir de los centrosomas. Tanto en las células animales como en las vegetales, el entramado del huso está formado por fibras que se extienden desde los polos al ecuador de la célula.

Otras fibras están unidas a las cromátides al nivel de los cinetocoros (proteínas asociadas con los centrómeros) (figura 6–4).

La profase finaliza con la desintegración de la envoltura nuclear y la desaparición de los nucleolos. Durante la metafase (del griego *meta,* después), las cromátides, dirigidas por las fibras del huso, se mueven hacia el centro de la célula. Al final de la metafase se disponen en el plano ecuatorial.

Durante la anafase (del griego *ana,* en oposición) se separan las cromátides hermanas y migran a los polos opuestos.

Durante la telofase (del griego *telos,* finalización) se forma una envoltura nuclear alrededor de cada grupo de cromosomas, el huso comienza a desintegrarse y los cromosomas se desenrollan para entrar nuevamente a interfase.

El plano de la división celular se establece en la fase G_2 tardía del ciclo celular, cuando los microtúbulos del citoesqueleto se reorganizan en una estructura circular, conocida como banda de preprofase.

Aunque esta banda desaparece al comenzar la profase, determina la ubicación futura del ecuador y de la placa celular. Los microtúbulos de la banda se reensamblan luego en el huso, en una zona clara que se origina alrededor del núcleo en el curso de la profase (figura 6–5).

Etapas de la mitosis

Profase

Es la primera etapa de la mitosis y meiosis; en ella se produce la condensación de todo el material genético (DNA) que normalmente existe en forma de cromátide condensada dentro de una estructura altamente ordenada llamada cromosoma, y el desarrollo bipolar del huso mitótico, el nucleolo y el nucleolema se disuelven. Los centriolos empiezan a moverse en dirección a los polos opuestos de la célula, los cromosomas condensados se hacen visibles al microscopio, la envoltura nuclear se rompe y comienza la formación del huso mitótico, un sistema de microtúbulos denominado aparato mitótico que permitirá la migración de los cromosomas. Este aparato mitótico está formado por:

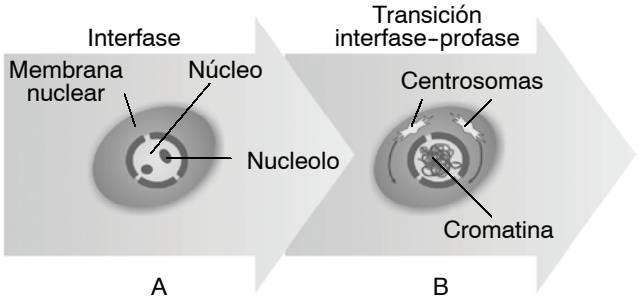


Figura 6–5. Esquema de la interfase y la transición a preprofase. ***A.*** Interfase. La cromatina se encuentra dispersa. ***B.*** Preprofase. La cromatina comienza a condensarse.

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

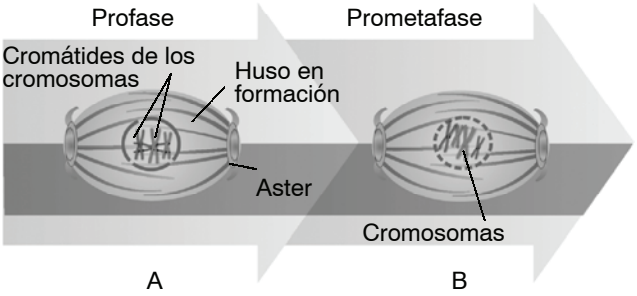


Figura 6-6. Esquela del inicio de la mitosis. ***A.*** Profase. La cromatina se compacta y forma los cromosomas compuestos por dos cromátides hermanas. ***B.*** El nucleolema se fragmenta y los microtúbulos del huso mitótico hacen contacto con los microtúbulos de los cinetocoros.

a. **Centriolos.** Están rodeados por el centrosoma. A medida que cada centriolo migra, tiene un hijo (centriolo perpendicular); cuando los centriolos llegan a los polos, ya se han dividido y se ven dos en cada polo.
b. **Ásteres.** Son el conjunto de microtúbulos cortos que se extienden desde cada centriolo.
c. **Huso acromático.** Tiene forma ovalada. Está formado por muchos microtúbulos sin ramificaciones.

Los centrómeros o constricciones primarias se hacen visibles también, debido a que se les han asociado a ambos lados placas proteicas, llamadas cinetocoros. En el citoplasma, el retículo endoplasmático y el complejo de Golgi se fragmentan formando vesículas; el citoesqueleto se desorganiza, por lo que la célula pierde su forma original y se hace esférica.

Entre la profase y la metafase existe un periodo intermedio llamado prometafase; en este periodo, los cromosomas condensados migran hacia la placa ecuatorial del huso acromático (figura 6-6).

Metafase

La metafase sigue a la profase. En este periodo aparece el huso mitótico, donde se insertan los cromosomas. Éstos, que constan de dos cromátides unidas por el centrómero, alcanzan su máxima condensación y migran al ecuador de la célula, donde las fibras del huso se adosan a las fibras del cinetocoro para formar la placa metafásica o ecuatorial. Se divide en:

Metafase temprana

Los pares de cromátides migran al centro y se alinean en el ecuador de la célula.

Metafase tardía

Los microtúbulos de los polos y de los cinetocoros tiran de cada par de cromátides hacia ambos lados del plano ecuatorial.

Anafase

Es la fase más corta de la mitosis; en ella, los microtúbulos separan los centrómeros longitudinalmente, lo que da lugar a cromátides independientes (cromosomas hijos). Los cromosomas hijos se desplazan a los polos opuestos dirigidos por los microtúbulos unidos a sus centrómeros. Cuando los cromosomas alcanzan los polos, sus microtúbulos se despolarizan (figura 6-7).

Telofase

En la telofase se reconstruye la cromátide, aparece el nucleolo y se reconstruye la envoltura nuclear, la cual se forma alrededor de cada dotación cromosómica, y los cromosomas se desenrollan y adquieren nuevamente un aspecto difuso. Los nucleolos reaparecen. El huso mitótico se desorganiza y la membrana plasmática se invagina para separar las dos células hijas, las cuales tienen exactamente la misma información genética y el mismo número cromosómico. Estas células pueden diferenciarse posteriormente en diferentes formas durante el desarrollo (figura 6-8).

Citocinesis

Tras la división nuclear se produce la división celular o citocinesis, formándose dos células hijas con la misma dotación cromosómica que la célula madre. La citocinesis es el proceso de separación de las células formadas; reaparecen los organelos y se restablece el citoesqueleto. La división del citoplasma se produce junto con la te-

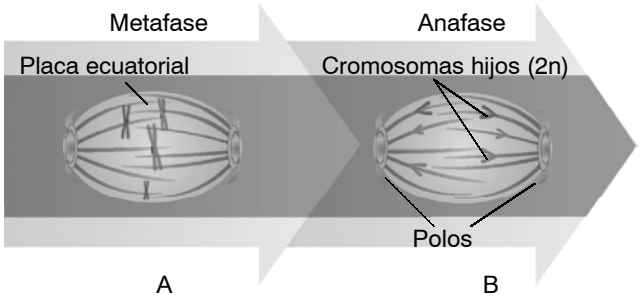


Figura 6-7. Esquema de la transición de la metafase a anafase. ***A.*** Metafase. Los centrómeros duplicados en los cromosomas se alinean en el plano ecuatorial de la célula. ***B.*** Anafase. Los centrómeros se dividen y cada uno de ellos se desplaza junto con las cromátides hacia los polos.

www.elsolucionario.org

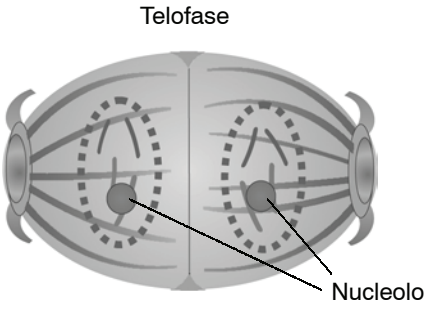


Figura 6-8. Esquema de la telofase. Los cromosomas llegan a los polos celulares y se desenrollan. Reaparecen el nucleolo y el plasmalema.

lofase, se produce un surco en la membrana plasmática, producido por un anillo de microfilamentos adosados a ella. Las dos células hijas se separan, distribuyéndose el citoplasma y los organelos de un modo equitativo.

En las células animales, la membrana comienza a constreñirse alrededor de la circunferencia de la célula, formando un anillo contráctil de actina y miosina. En las células vegetales, las vesículas producidas dividen al citoplasma en la línea media formando una placa celular que crece en forma centrífuga y se fusiona a la membrana de la célula madre, dividiendo la célula en dos.

Cuando la citocinesis no se presenta, los dos núcleos quedan en el mismo citoplasma, y resulta una sola célula binucleada. Cuando se completa la división celular, se han producido dos células hijas, más pequeñas que la célula progenitora, pero indistinguibles morfológicamente de ésta.

MEIOSIS

Su nombre deriva del griego *meiosis,* reducción, de *meion,* menor). Es un proceso de reducción cromosómica a la mitad, pero sin perder la información genética

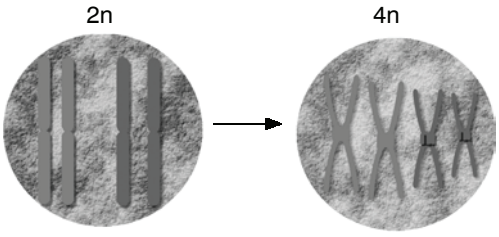


Figura 6-9. Duplicación de los cromosomas en la célula progenitora (4n). Antes de iniciarse la primera división o meiosis I (etapa reduccional), los cromosomas se duplican.

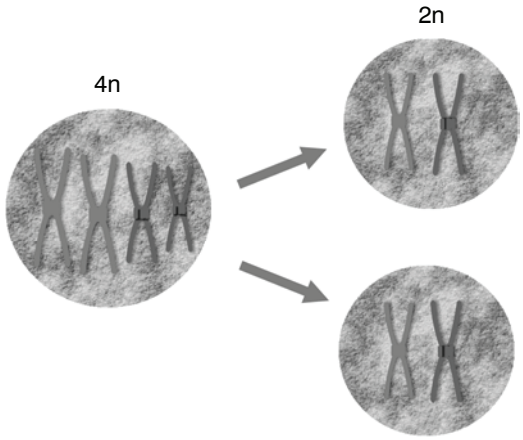


Figura 6-10. Después de la primera división meiótica, los cromosomas homólogos se separan formándose dos células hijas. Aunque los cromosomas están duplicados, cada uno de ellos está formado por dos cromátides unidas por el centrómero (2n).

que mantiene los rasgos estructurales y funcionales del organismo. En la meiosis I (etapa reduccional) se reduce el número diploide (4n) (figura 6-9) de cromosomas a la mitad o haploide (2n), pero todavía los cromosomas son dobles (figura 6-10). En la meiosis II (etapa ecuacional) se mantiene el número cromosómico haploide (del griego *haploos,* único) conseguido en la etapa anterior, pero los cromosomas son simples (1n). La "n" significa 23 cromosomas simples (figura 6-11).

La meiosis proporciona, a través de la reproducción sexual, una variabilidad genética; gracias al entrecruzamiento y la reducción evita que exista un alto número de cromosomas en la fecundación con el mismo material genético que el de las células progenitoras. Este mecanismo de división celular les da ventaja genética a los organismos superiores que se perpetúan por reproducción sexual.

En las células germinales, la meiosis es el proceso de división celular por el cual se forman los gametos haploides a partir de las células germinales diploides. En

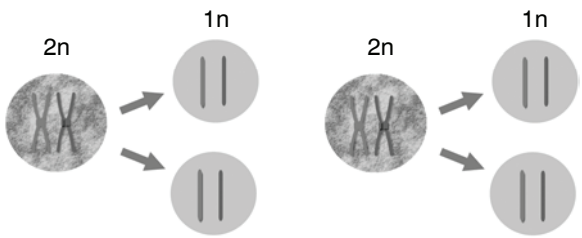


Figura 6-11. Después de la segunda división meiótica similar a la mitosis, los cromosomas se separan en sus dos cromátides, formando cuatro células haploides (1n).

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

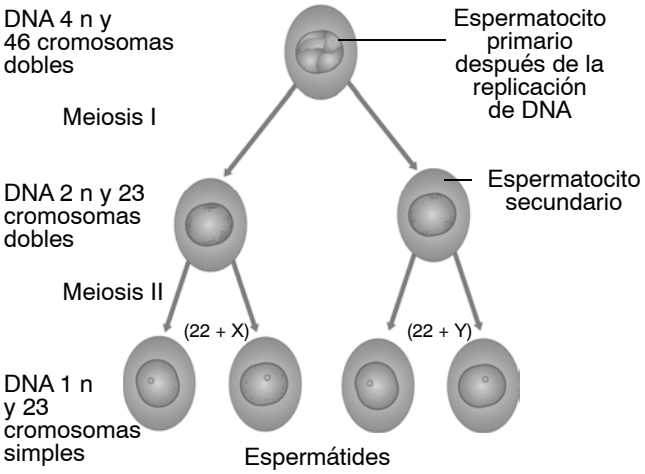


Figura 6-12. Esquema de la meiosis en el hombre. A partir de cada espermatocito primario diploide 4n se obtienen cuatro espermátides haploides 1n, que posteriormente se diferencian en cuatro espermatozoides.

la fecundación, los gametos (óvulos y espermatozoides) haploides se fusionan, restableciéndose en el cigoto el número diploide. Las células somáticas son diploides durante casi todo el ciclo de vida, mientras que los gametos son haploides. Los errores en la meiosis son responsables de las principales anomalías cromosómicas. La meiosis tiene una primera división reduccional, la meiosis I o primera división meiótica, y una segunda división ecuacional, la meiosis II o segunda división meiótica. En estas dos etapas consecutivas no existe la etapa S entre ellas, por lo que no se duplica el material genético, sino que se reduce. A partir de una célula 4n se obtienen cuatro células 1n. En la especie humana, a partir de cada espermatocito primario diploide se forman, en el hombre, cuatro espermátides haploides, que se diferencian posteriormente en cuatro espermatozoides (figura 6-12). Por otra parte, en la mujer, cada ovocito primario diploide formará un solo ovocito haploide; los núcleos haploides restantes forman los cuerpos o corpúsculos polares que se desintegran (figura 6-13).

Primera división meiótica

Profase I

La profase I de la primera división meiótica es la etapa más compleja de la meiosis. Se divide, a su vez, en cinco subetapas.

Leptonema

También conocida como leptoteno, su nombre deriva del griego *leptos,* delgado. Es el primer estadio de la profase I en la meiosis. Los cromosomas se hacen visibles y se disponen en una configuración en ramillete, con uno o ambos extremos reunidos en un punto de la membrana nuclear interna. Los cromosomas contienen dos cromátides hermanas estrechamente unidas. Es la etapa en donde se produce la duplicación de la cadena de DNA.

Cigonema

También conocida como zigoteno, su nombre deriva del griego *zygon,* yugo o unión. Los cromosomas homólogos comienzan a acercarse hasta quedar enfrentados entre sí. Los pares homólogos quedan finalmente apareados cromómero a cromómero formando sinapsis (del griego *synapsis,* ligamiento). La disposición de los cromómeros a lo largo del cromosoma está determinada genéticamente.

Los cromosomas homólogos se reconocen entre sí porque sus telómeros se encuentran anclados en regiones próximas de la membrana nuclear. El eje proteico central del leptoteno desempeña un papel importante en el apareamiento de los homólogos al formar los elementos laterales del complejo sinaptonémico, una estructura proteica en forma de escalerilla formada por dos elementos laterales y uno central que se van cerrando a modo de cremallera, y que garantiza el apareamiento perfecto entre homólogos (figura 6-14).

En esta fase, cada pareja de cromosomas se llama bivalente (dos cromosomas homólogos unidos). En el apareamiento entre homólogos también está implicada la secuencia de genes de cada cromosoma, lo cual evita el apareamiento entre cromosomas no homólogos. Asi-

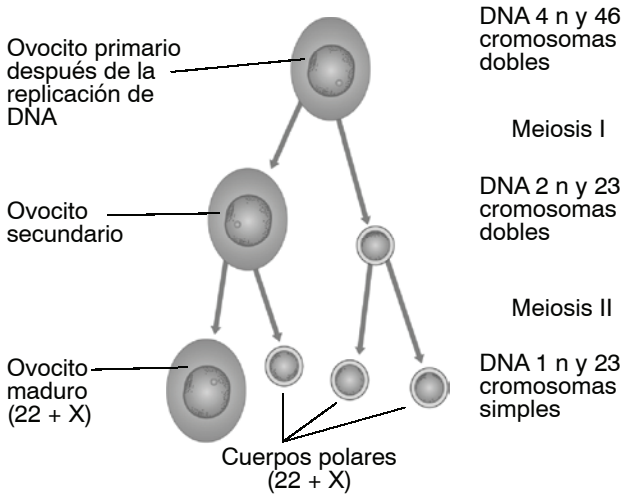


Figura 6-13. Esquema de la meiosis en la mujer. Cada ovocito primario diploide 4n formará un solo ovocito haploide 1n; los núcleos haploides restantes forman los cuerpos o corpúsculos polares que se desintegran.

www.elsolucionario.org

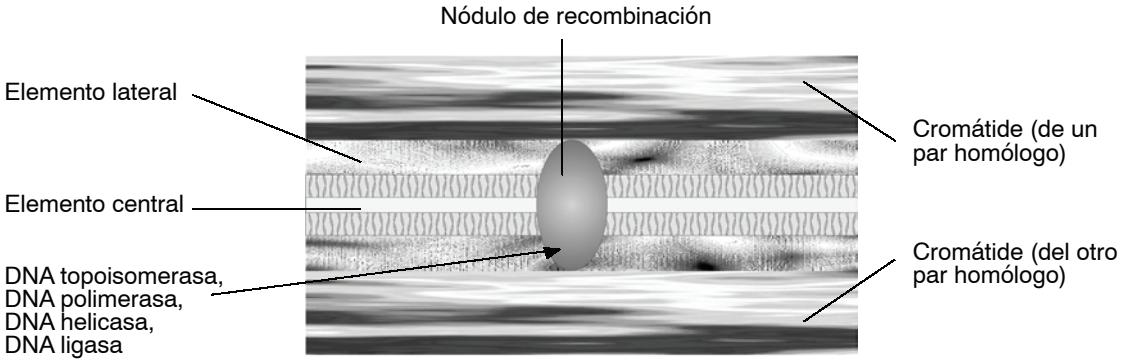


Figura 6-14. Esquema del complejo sinaptonémico. Algunas de las enzimas que participan en este complejo son la DNA topoisomerasa, la DNA ligasa, la DNA helicasa y la DNA polimerasa.

mismo, en este periodo termina la replicación del DNA (2% restante), que recibe el nombre de zig-DNA.

Paquinema

También conocida como paquiteno, su nombre deriva del griego *pakys,* grueso. Los cromosomas se acortan y se engruesan. Una vez que los cromosomas homólogos se encuentran apareados formando estructuras bivalentes, se produce el fenómeno de recombinación genética *(crossing-over),* donde se intercambia el material genético entre los cromosomas homólogos de cada pareja. Esta recombinación genética está mediada por la aparición entre los dos homólogos de una estructura proteica de 90 nm de diámetro llamada nódulo de recombinación y que contiene las enzimas necesarias para el proceso de recombinación. También se sintetiza una pequeña cantidad de DNA relacionado con fenómenos de reparación del mismo y en relación con el proceso de recombinación. Este periodo puede durar varios días, en los cuales la sinapsis se completa.

Diplonema

También conocida como diploteno, su nombre deriva del griego *diploos,* doble.

Los cromosomas continúan condensándose hasta que pueden comenzar a observarse las dos cromátides de cada cromosoma, por lo que a los bivalentes del paquiteno se les llama tétradas (cuatro cromátides unidas por quiasmas o centrómeros).

En este periodo se observan unas estructuras en forma de "X" denominadas quiasmas (del griego *chiasmas,* posición cruzada), que son los lugares del cromosoma donde se ha producido la recombinación.

En este punto, la meiosis se puede detener, como ocurre en el caso de la formación de los óvulos humanos. Así, la línea germinal de los óvulos humanos sufre esta pausa hacia el séptimo mes del desarrollo embrionario.

El proceso de meiosis continuará hasta la pubertad y sólo en los folículos que maduran. A este estado de latencia se le denomina dictioteno, y puede durar hasta 50 años.

Diacinesis

Es el final de la profase I meiótica; su nombre deriva del griego *dia,* a través, culminación, y *kinesis,* movimiento. Esta etapa casi no se distingue del diploteno. Los cromosomas se observan un poco más condensados, así como los quiasmas, los cuales se desplazan a los extremos de los cromosomas (terminalización).

El final de la diacinesis o de la profase I meiótica se manifiesta por la ruptura de la membrana nuclear. Durante toda la profase I existe síntesis de RNA en el núcleo.

Al final de la diacinesis, la síntesis de RNA se detiene y el nucleolo desaparece.

Prometafase meiótica I

Al término de esta fase, el nucleolema y el nucleolo desaparecen totalmente y empieza la unión de las parejas de cromosomas a los microtúbulos del cinetocoro.

Metafase meiótica I

Las parejas de cromosomas homólogos, o bivalentes, se disponen en el plano ecuatorial. Se pueden observar todavía algunos quiasmas terminales.

Existen dos opciones de migración en los cromosomas:

- **a.** Los dos cromosomas paternos pueden migrar juntos a un polo y los dos maternos, al opuesto.
- **b.** La otra posibilidad es que migren al mismo polo el cromosoma materno del par homólogo y el paterno del par homólogo. Entonces los otros cro-

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

mosomas migran al polo opuesto; de esta manera la descendencia compartirá cromosomas paternos y maternos.

Anafase meiótica I

Se separan los bivalentes, y cada uno de los cromosomas emigra a uno de los polos. El material genético pasa entonces de diploide a haploide con un cromosoma de cada progenitor.

Telofase meiótica I

Es la separación final en dos células hijas que contienen 2n de DNA.

Citocinesis

Se produce de manera simultánea con la telofase, y da como resultado dos células hijas con un número haploide de cromosomas 2n, ya que cada cromosoma contiene dos cromátides.

Intercinesis

Este periodo se ubica entre la meiosis I y la II y no se realiza duplicación del DNA (división celular reduccional).

Segunda división meiótica

Es la etapa en donde las cromátides se separan de cada cromosoma. Esto ocurre durante la anafase, donde cada cromátide migra a un polo distinto.

Conforme se va formando la pared celular, las cromátides se van desenrollando, y reaparecen los nuevos núcleos con sus nucleolemas. Esta etapa es similar a una mitosis normal.

Profase II

Los cromosomas se condensan, se desintegran los nucleolos, los centriolos migran a los polos y se duplican. Se forma el huso acromático, y el plasmalema se desorganiza y se fragmenta.

Prometafase II

En esta fase, los cromosomas condensados migran al centro para situarse en la placa ecuatorial de la célula.

Metafase II

Los cromosomas se alinean en la placa ecuatorial. Cada cromosoma se fija a un microtúbulo del huso acromático.

Anafase II

El centrómero se divide y se separan las dos cromátides hermanas de cada cromosoma. Cada una migra a uno de los polos.

Telofase II

Los grupos cromosómicos llegan a los polos (1n), y el huso acromático se desorganiza y se fragmenta. El plasmalema y el nucleolo se reorganizan, los cromosomas se desenrollan y se transforman en cromatina interfásica.

Citocinesis

Se separan los citoplasmas de las células hijas. Al final se forman cuatro células a partir de una célula progenitora.

La meiosis se produce sólo en la reproducción sexual. Las cromátides no hermanas (paterna y materna) pueden entrecruzarse y romperse en los puntos de fusión, dando lugar a un intercambio y recombinación genética.

La reproducción sexual proporciona una gran cantidad de variaciones genéticas. Cuanto mayor sea la diversidad de gametos formados en cada progenitor, mayor será la probabilidad de originar combinaciones diferentes por fecundación, y mayor la diversidad genética en la descendencia (figura 6-15).

CONTROL DEL CICLO CELULAR

En el año 2001, Paul M. Nurse, Leland H. Hartwell y R. Timothy Hunt ganaron el premio Nobel de Medicina y Fisiología por haber descubierto las ciclinas y las cinasas dependientes de ciclinas o CDC (CDK, por sus siglas en inglés). La regulación del crecimiento y de la división celular es muy compleja. La división celular se activa por las señales de transducción intracelulares que a su vez han sido puestas en marcha por la estimulación de los factores de crecimiento sobre sus receptores. El ciclo celular está bajo control genético muy estricto, en

www.elsolucionario.org

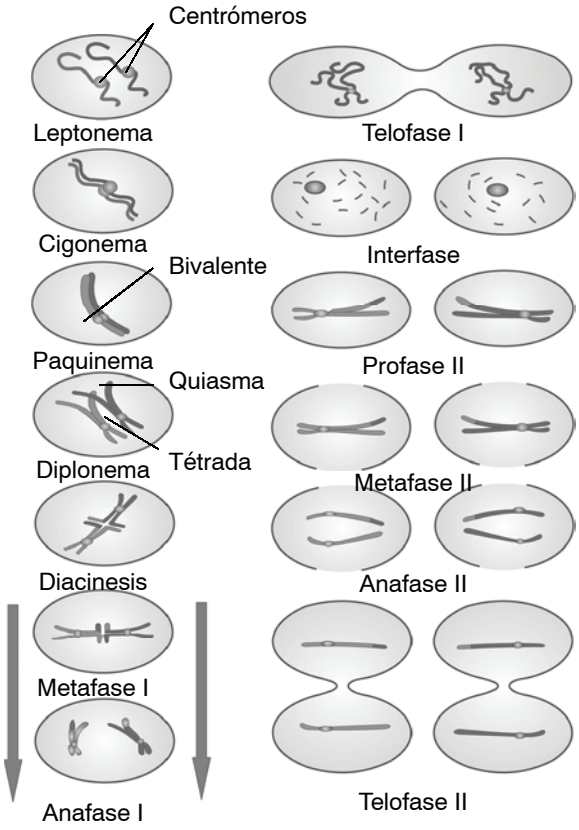


Figura 6-15. Esquema de los sucesos que ocurren en la meiosis. En la meiosis I (etapa reduccional) se reduce el número diploide (4n) de cromosomas a la mitad o haploide (2n), pero los cromosomas aún son dobles. En la meiosis II (etapa ecuacional) se mantiene el número cromosómico haploide, pero los cromosomas son simples (1n). La n significa 23 cromosomas simples.

el cual interviene un complejo entramado de genes y proteínas que aseguran la normal proliferación y división celular. Una de las características que definen a las células tumorales es su capacidad para entrar en el ciclo celular y progresar en condiciones en las cuales una célula normal estaría en periodo quiescente G_0. La regulación del ciclo celular es fundamental para mantener el equilibrio homeostático entre crecimiento celular, diferenciación, supervivencia y muerte celular. En el adulto, algunas células están continuamente entrando en ciclo celular; tal es el caso de las células hematopoyéticas, que están convenientemente activadas por factores de crecimiento, pero otras pasan largo tiempo en periodo G_0, como las células hepáticas (de uno a dos años), e incluso toda la vida, como ocurre con las neuronas.

El ciclo celular se regula a través de fosforilaciones y defosforilaciones de proteínas; las enzimas que llevan a cabo estas actividades son complejos de cinasas formada por proteínas, las CDC con actividad catalítica y las ciclinas, que son las subunidades regulatorias de estos complejos; es decir, la CDC sólo se encuentra activa si está asociada a la ciclina. La ciclina, además de estabilizar a la CDC, también contribuye a la localización celular y confiere especificidad de sustratos. El funcionamiento correcto de los procesos del ciclo celular requiere cambios en los complejos enzimáticos. Los complejos CDC–ciclina dirigen a la célula de una fase a otra del ciclo celular. Por lo tanto, la dinámica del ciclo dependerá de las formas activas o inactivas de los complejos CDC–ciclina, entre otros muchos sucesos (figura 6-16).

Aunque inicialmente se estudió la función de los complejos CDC–ciclina en *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces pombe,* se han identificado enzimas con actividades similares en mamíferos. Los estudios en levaduras aún emplean los términos de p34cdc2 para CDC1; sin embargo, las funciones en el ciclo celular son idénticas.

Se sabe que CDC4, CDC2 y CDC5 se expresan conjuntamente con las ciclinas D1, D2, D3, E, A y B durante la progresión de la fase G_1 a la fase M (mitosis). El complejo CDC4–D funciona tempranamente en respuesta a factores de crecimiento. Los complejos CDC2–E y CDC2–A son esenciales para la replicación del DNA, y los complejos CDC2–A, CDC2–B, CDC1–A y CDC1–B son importantes para la transición G_2–mitosis. La mayoría de los complejos CDC–ciclina de mamíferos pueden complementar funcionalmente los correspondientes complejos de levadura, y lo mismo ocurre para las enzimas que regulan la actividad de las cinasas, lo que sugiere que por la importante función que tienen los complejos CDC–ciclina en el ciclo celular, éstos se han conservado durante la evolución de los eucariotas.

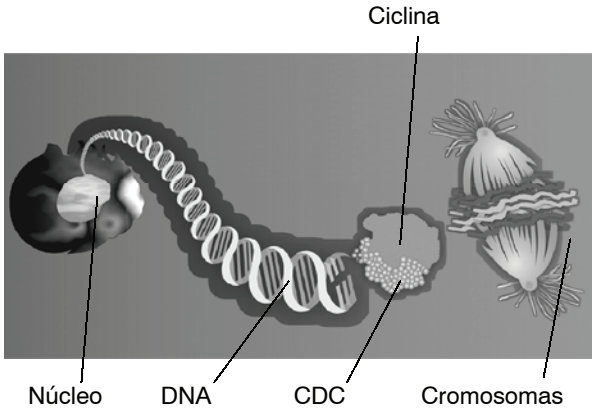


Figura 6-16. Esquema del complejo CDC–ciclina y su influencia en la división celular. Los complejos CDC–ciclina dirigen a la célula de una fase a otra del ciclo celular. De esta manera, la dinámica del ciclo celular dependerá principalmente de las formas activas o inactivas de los complejos CDC–ciclina.

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

Cuando existe algún daño genético, los mecanismos de control transcripcional de los complejos CDC-ciclina inducen la interrupción del ciclo celular hasta que el daño se corrige. Esto ocurre en *S. cerevisiae* y en oocitos de *Xenopus.* En mamíferos, la interrupción de la proliferación de la línea celular MuLu por TGF-β1 es mediada por la proteína *p*27, que evita el ensamblaje y activación del complejo CDC2-E.

Además, se han identificado en mamíferos otras dos proteínas inhibidoras de la actividad de los complejos CDC-ciclina: *p*16 y *p*21, las cuales bloquean la progresión del ciclo celular en la fase G_1, aunque pueden tener otras funciones aún no conocidas. La inducción de *p*21 (WAF1 o CIP1) depende de *p*53 y ocurre cuando las células tienen daño en el DNA.

La proteína *p*21 interfiere en la actividad de cinasa del complejo CDC4-ciclina D y CDC2-ciclina E. La proteína *p*16 inhibe la activación de CDC4-ciclina D1. Durante la transición de la fase G_1 a la fase S, diferentes sustratos pueden ser blanco de los complejos CDC2-ciclina E, como por ejemplo la proteína supresora de tumores pRb (proteína de retinoblastoma, donde se identificó). La proteína pRb se asocia con el factor transcripcional E2F durante la fase G_1, y cuando pRb se fosforila, libera a E2F, el cual participa en la transcripción de varios genes requeridos en el ciclo celular, principalmente durante la fase S o replicación del DNA.

Estos mecanismos de control pueden ser activados por diferentes señales fisiológicas que pueden actuar sobre complejos CDC-ciclina. La fosforilación de proteínas está implicada en los procesos que tienen lugar a lo largo del ciclo celular, como la síntesis de DNA y la mitosis; la fosforilación de proteínas se lleva a cabo a través de la transferencia de grupos fosfato desde el ATP a la proteína.

En el ciclo celular existen puntos de restricción que impiden la continuación del ciclo celular si la célula tiene lesiones en el DNA, no ha alcanzando el tamaño adecuado, carece de nutrientes o recibe señales químicas externas. Estos puntos de restricción son (figura 6-17):

- **Punto de restricción R.** Se manifiesta en la fase G_1, en la que la célula comprueba que ha generado la masa necesaria para seguir adelante y comenzar la síntesis de DNA y, también, que las condiciones ambientales son favorables (nutrientes, sales y temperatura adecuadas, etc.), y los factores tróficos. Se considera el punto de control más importante.
- **Punto de restricción G_2-M.** Se presenta al final de la fase G_2, en la que la célula debe comprobar dos condiciones antes de proseguir: que ha duplicado la masa celular para dar lugar a dos células hijas y que ha completado la replicación del DNA una sola vez (tetraploide o 4n).
- **Punto de restricción M.** Este control ocurre en la mitosis. Sólo permite continuar con la división celular si todos los cromosomas están alineados sobre el huso mitótico y éste está intacto.

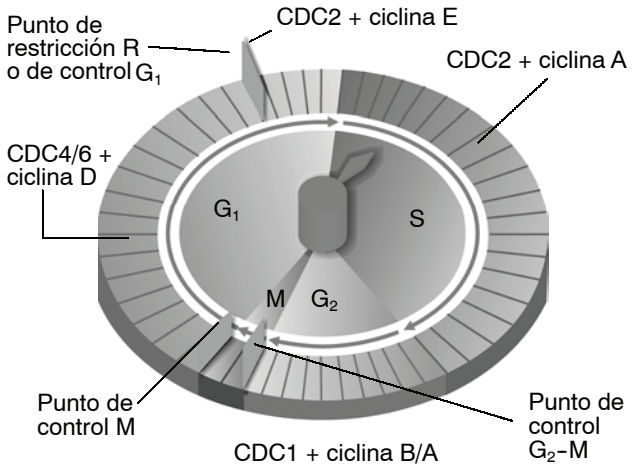


Figura 6-17. Modelo del motor CDC-ciclina durante el ciclo celular en células eucariotas y de los puntos de restricción. El punto de restricción R se manifiesta en la fase G_1. El punto de restricción G_2-M se presenta al final de la fase G_2. El punto de restricción M se ubica en la mitosis y sólo permite continuar con la división celular si todos los cromosomas están alineados sobre el huso mitótico y éste está intacto.

CICLINAS

Las ciclinas son una familia de proteínas que, como indica su nombre, son sintetizadas y destruidas durante una determinada fase del ciclo celular. Hasta la fecha se han descrito las siguientes ciclinas: A, B1, B2, C, D1, D2, D3, E, F, G1, G2, H, I, K, T1 y T2. Todas ellas contienen una región común conocida como *cyclin box,* de aproximadamente 150 aminoácidos, que es un dominio relativamente conservado y es responsable de la unión y activación de las CDC. Las mutaciones en esta región inhiben tanto la unión como la activación.

Las ciclinas C, D y E (o ciclinas de G_1) son proteínas de vida corta que funcionan principalmente durante la fase G_1 y en la transición de G_1-S, siendo destruidas por la vía de la ubicuitina (figuras 6-17 y 6-18).

La vía de la ubicuitina es ATP dependiente e implica la unión covalente de moléculas de ubicuitina a los sustratos blanco. Las proteínas modificadas de esta manera

www.elsolucionario.org

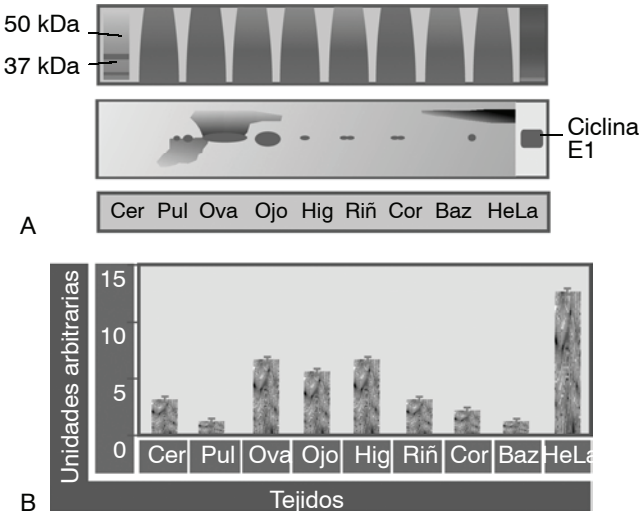


Figura 6-18. Western Blot de ciclina E1. Se realizó una determinación de la ciclina E1 en tejidos de rata Wistar normal. ***A.*** En las fotografías superiores se observan geles de poliacrilamida que muestran las bandas de ciclina E1. ***B.*** En las gráficas se muestra la densitometría (cantidad relativa de ciclina E1). Los tejidos que más expresan esta ciclina son ovario, ojo, hígado, riñón y células de la línea tumoral HeLa.

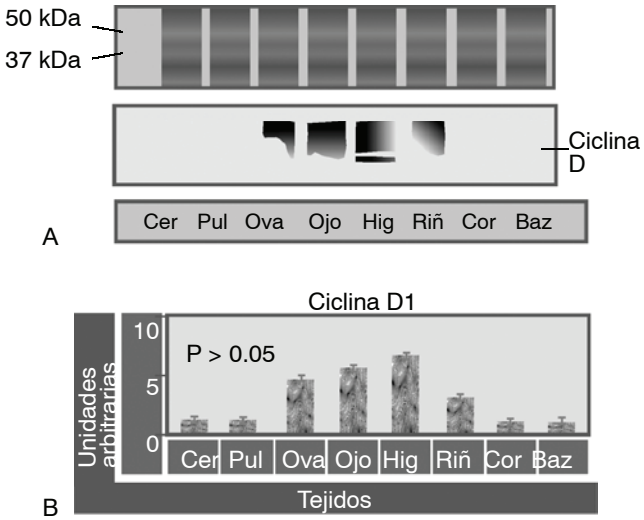


Figura 6-19. Western Blot de ciclina D1. Se realizó una determinación de la ciclina D1 en tejidos de rata Wistar normal. ***A.*** En las fotografías superiores se observan geles de poliacrilamida que muestran las bandas de ciclina D1. ***B.*** En las gráficas se muestra la densitometría (cantidad relativa de ciclina D1). Los tejidos que más expresan esta ciclina son ovario, ojo, hígado y riñón.

son reconocidas y degradadas por el proteasoma. La proteólisis mediada por la proteína ubicuitina desempeña un papel crucial en el control del ciclo celular, ya que la irreversibilidad de la proteólisis provee de una fuerte direccionalidad al ciclo celular, forzando a seguir hacia delante en varias etapas críticas.

La expresión de ciclina D (D1, D2, D3) se estimula por factores de crecimiento (figuras 6-17 y 6-19). Cuando ésta se expresa constantemente, sin la necesidad de factores de crecimiento, las células tienen tendencia a mantenerse en un ciclo de división constante.

Se le considera como un oncogén aunque por sí misma no es capaz de transformar una célula normal en cancerosa, pero colabora con otros oncogenes. Esta ciclina actúa al final del periodo G_1 y promueve el paso de G_1 a S (punto de restricción). Las ciclinas A y B son ciclinas mitóticas que permanecen estables durante la interfase, pero son rápidamente proteolizadas durante la mitosis, por una vía también dependiente de la ubicuitina. Se ha observado que mutaciones en la ciclina A producen la inhibición de la iniciación de la mitosis, parando las células en la fase G_2.

La ciclina F actúa en la transición de la fase G_2 a la fase M, y la ciclina G actúa en respuesta al daño del DNA. En 1994, Fischer y Morgan purificaron la ciclina H, la cual forma complejos con la CDC7, para producir una enzima conocida como cinasa que activa a las CDC o CAK (*CDK activating kinase*) (figura 6-20).

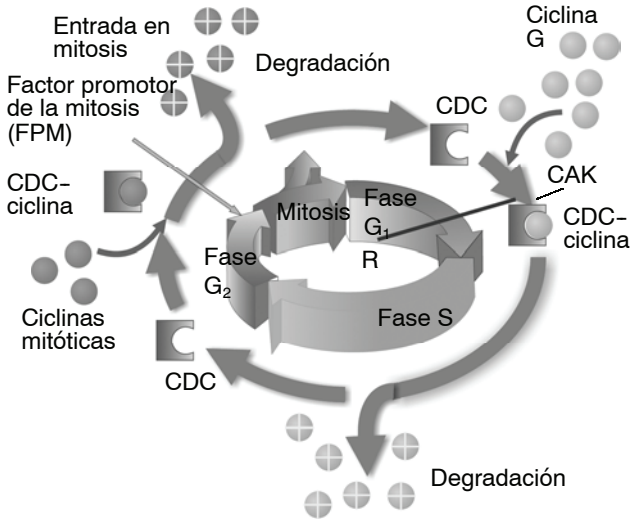


Figura 6-20. Esquema de la relación CDC-ciclina. Las cinasas dependientes de ciclina (CDC) se asocian con las ciclinas en las etapas del ciclo celular, formando el complejo CDC-ciclina. La activación de este complejo activa procesos que conducen a la célula a través de las distintas fases del ciclo. La degradación de las ciclinas inactiva el complejo. La ciclina H o CAK actúa sobre CDC2 en las fases G_1 y S.

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

CINASAS DEPENDIENTES DE CICLINA (CDC)

Las cinasas anexan un grupo fosfato a las proteínas. Las CDC y las ciclinas son las principales controladoras del ciclo celular, provocando que la célula pase de G_1 a S o de G_2 a M.

Las CDC son una familia de proteínas cinasas que se unen a ciclinas específicas y son activadas por ellas. Hasta la fecha se han descrito al menos nueve CDC: CDC1, *p*34 o FPM, factor promotor de la fase M o factor promotor de la maduración; está formado por la CDC y las ciclinas que desencadenan la progresión del ciclo celular como ciclina B, CDC2, CDC3, CDC4, CDC5, CDC6, CDC7, CDC8 y CDC9. Las CDC4, CDC5 y CDC6 forman complejos con las ciclinas de la familia D y funcionan durante la fase G_0/G_1 del ciclo (figuras 6-17, 6-20 y 6-21).

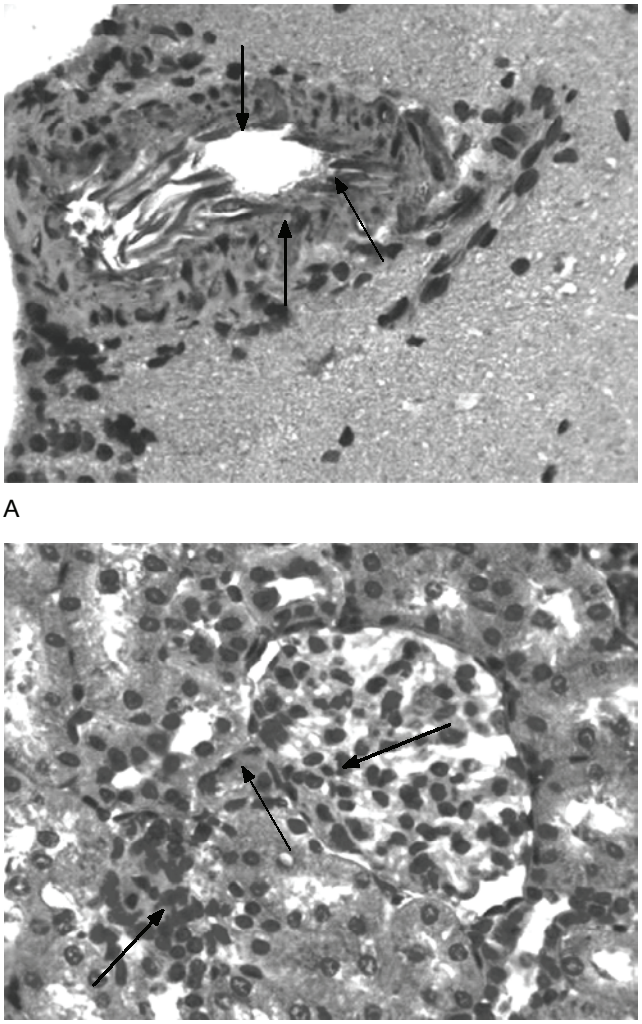
Una de las funciones de los complejos ciclina D/CDC4 es fosforilar la proteína del retinoblastoma (Rb) y activar así la expresión de genes necesarios para la entrada en la fase S.

La CDC2 puede unirse también a miembros de la familia de la ciclina D, pero más comúnmente se asocia con las ciclinas A y E, y están implicadas en el inicio de la fase S, es decir, en la replicación del DNA. Así, el complejo ciclina A/CDC2 parece tener un papel en el control de la elongación de la síntesis de DNA (figuras 6-17 y 6-22).

Como se mencionó anteriormente, CDC7 se encuentra asociada con la ciclina H y tiene la capacidad de fosforilar y activar a CDC2 que se une a las ciclinas mitóticas A y B. Los complejos ciclinas B y CDC2 son los más importantes, rápidamente se activan durante la mitosis y se asocian al huso acromático en la metafase. La ciclina B se degrada en la transición de la metafase a anafase, causando la inactivación de la CDC2 para la finalización de la mitosis; además, el punto de control M controla la degradación de la ciclina B1.

No todas las ciclinas y CDC funcionan como reguladoras del ciclo celular. Se han descrito otras funciones para las ciclinas y CDC, como regulación de la transcripción, reparación del DNA y diferenciación, además de apoptosis. Por ejemplo, se sabe que diferentes complejos CDC/ciclina, como ciclina C/CDC8, ciclina T/CDC y ciclina H/CDC7, son componentes de la maquinaria basal de transcripción.

Por otro lado, la ciclina K forma un complejo con la RNA polimerasa II a través de la activación de una CDC.



A

B

Figura 6-21. Inmunolocalización del factor promotor de la mitosis o de la maduración (FPM). ***A.*** Fotografías de una arteria cerebral que muestra, en su capa media muscular, expresión para el FPM. ***B.*** Se muestran túbulos distales renales que expresan el FPM. Las flechas indican el sitio de expresión en rojo. Inmunohistoquímica para el FPM con técnica de fosfatasa alcalina y rojo rápido. 200 X.

Inhibidores de las cinasas dependientes de ciclina

Además de esta serie de reguladores positivos del ciclo celular (ciclinas y CDC), existe una familia de reguladores negativos, denominados inhibidores de las cinasas dependientes de ciclinas, que bloquean la actividad de uno o varios complejos ciclina-CDC. En las células animales se dividen en dos familias distintas, que difieren en estructura, mecanismo de acción y especificidad: la familia *kinase interacting protein* y *calcium and integrin binding protein* KIP/CIP y la familia *cyclin depen-*

www.elsolucionario.org

dent kinase inhibitor 2A INK4 o CDKN2A. Estas proteínas inhibidoras de las CDC están implicadas en la detención del ciclo celular en respuesta a varias señales antiproliferativas, como privación de factores de crecimiento, citocinas y daño en el DNA celular, entre otras.

La familia KIP/CIP incluye tres proteínas estructuralmente relacionadas entre sí: *p*21, *p*27 y *p*57, y presenta una más amplia especificidad que la familia INK4, ya que sus miembros interactúan e inhiben la actividad cinasa de los complejos ciclina E/CDC2, ciclina D/CDC4, ciclina D/CDC6, ciclina A/CDC2 y ciclina B/CDC2, y actúan a lo largo del ciclo celular.

La proteína *p*21 (también llamada *CDK interacting protein 1 Cip I*, *Wildtype p53 activated fragment 1* WAF1) fue el primer miembro aislado de la familia. Diferentes investigadores aislaron la *p*21 gracias a su capacidad para interactuar con CDC2, aunque puede inhibir otros complejos ciclinas conteniendo otras CDC, como la CDC4. Además, *p*21 también puede unirse al antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), una subunidad de la DNA polimerasa delta, y así inhibir directamente la síntesis de DNA (figura 6-23). El gen *p*21 fue clonado como un gen inducido por la proteína supresora de tumores *p*53.

Cuando el DNA es dañado, se provoca un incremento de la concentración y de la actividad de la proteína *p*53. Cuando se activa la proteína *p*53, estimula la transcripción de un gen que codifica para la proteína *p*21 el

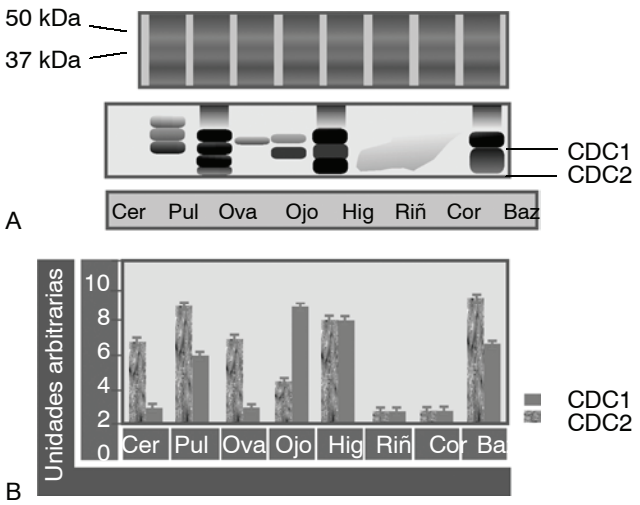


Figura 6-22. Western Blot de las cinasas dependientes de ciclinas 1 y 2 (CDC1 y CDC2). Se realizó una determinación de las CDC1 y CDC2 en tejidos de rata Wistar normal. ***A.*** En las fotografías superiores se observan geles de poliacrilamida que muestran las bandas de estas enzimas. ***B.*** En las gráficas se muestra la densitometría de CDC1 y CDC2 que se expresa en diferentes tejidos.

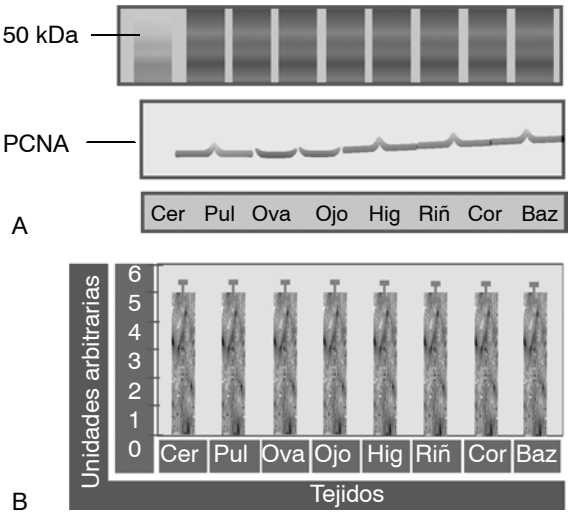


Figura 6-23. Western Blot del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), una subunidad de la DNA polimerasa delta. Se realizó una determinación del PCNA en tejidos de rata Wistar normal. ***A.*** En las fotografías superiores se observan geles de poliacrilamida que muestran las bandas de esta proteína. ***B.*** En las gráficas se muestra la densitometría del PCNA que se expresa en diferentes tejidos; se observa una expresión uniforme.

WAF1. La proteína *p*21 bloquea el ciclo celular en la transición G_1-S, uniéndose a complejos ciclina-CDC (ciclina D/CDC4 y ciclina E/CDC2), responsables de conducir a la célula a la fase S. Esta detención del ciclo celular permite a la célula reparar el DNA dañado antes de replicarse. El gen *p*21 se localiza en la región p21.2 del cromosoma 6, y fue aislado como un gen que se acumula en células próximas a la senescencia, sugiriendo que esta proteína puede desempeñar un papel importante en este proceso.

La proteína *p*27 o CDKN1B (KIP1) es una proteína que se une a ciclinas y CDC bloqueando la entrada en fase S, y su gen se localiza en la región p13 del cromosoma 12. Media señales inhibidoras del crecimiento, como la del factor de crecimiento transformante β (TGF-β) y la inhibición por contacto. Los ratones que carecen de esta proteína son anormalmente grandes, con hiperplasia en diferentes órganos. La proteína *p*57 o KIP2, a diferencia de la expresión ubicua de las proteínas *p*21 y *p*27, tiene una ruta de expresión tejido específica, lo que sugiere un papel especializado en el control del ciclo celular; su gen se localiza en 11p15.5. Los niveles bajos de *p*27 predicen un mal pronóstico para las pacientes con cáncer de mama.

La familia INK4 incluye cinco proteínas: *p*14, *p*15 (INK4B), *p*16 (INK4A), *p*18 (INK4C) y *p*19 (INK4D), las cuales inhiben específicamente los complejos de ciclina D/CDC4 y D/CDC6 que están implicados en el

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

control de la fase G_1. A diferencia de las proteínas de la familia KIP/CIP, que se unen a complejos CDC/ciclina, la familia INK4 se une a subunidades monoméricas, y su mecanismo de acción consiste en competir con las ciclinas por las subunidades catalíticas CDC.

La proteína *p*16 regula el estatus de la proteína pRb. Al igual que con el gen pRb, el gen *p*16 está alterado en muchos tumores humanos. A pesar de la fuerte homología que existe entre las proteínas *p*15 y *p*16, ambas parecen desempeñar diferentes funciones biológicas. Así, el nivel de la proteína *p*15 no parece estar afectado por la proteína pRb, aunque sí es inducido por un factor inhibidor del crecimiento, como el TGF-β.

Las proteínas *p*18 y *p*19 responden a estímulos extracelulares, ya que en algunos tipos de células tratadas con interferón se altera la expresión de *p*18. Además, la interleucina 6 induce la expresión de las proteínas *p*16 y *p*18 en células hematopoyéticas, y se correlaciona con la detención del ciclo celular en G_1 y diferenciación terminal.

Existe una homeostasis entre las células quiescentes, o en fase G_0, y las que entran en el ciclo celular, o células proliferantes, debido a factores de crecimiento y factores inhibidores del ciclo celular. Los células de los tejidos normales pueden multiplicarse muy rápido y en orden, como las células intestinales, o permanecer quiescentes durante mucho tiempo o toda la vida, como las neuronas. Las células tumorales de las neoplasias han perdido este control. Aparte de los inhibidores de CDC, existen otros reguladores negativos del ciclo celular, que son los formados por los productos de los genes supresores de tumores *p*53 y Rb, que pueden interactuar y modular las actividades de los complejos CDC/ciclina (figura 6-24).

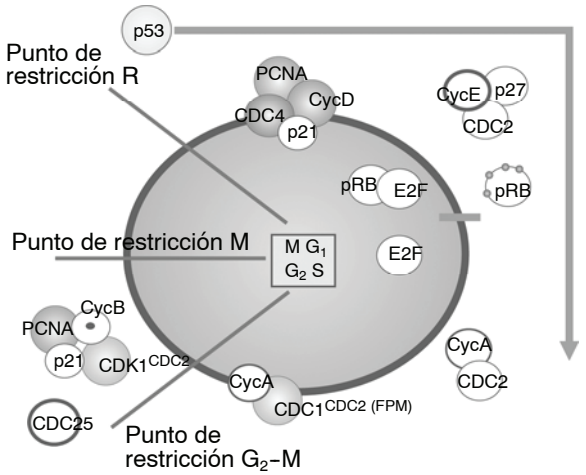


Figura 6-24. Proteínas que controlan el ciclo celular. Aparte de los inhibidores de cinasas dependientes de ciclina, existen otros reguladores negativos del ciclo celular, que son los formados por los productos de los genes supresores de tumores *p*53 y Rb, que pueden interactuar y modular las actividades de los complejos CDC/ciclina.

TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES Y CICLO CELULAR

Como ya hemos explicado, la activación celular es un programa finamente regulado en el que participa una gran cantidad de elementos que son regulados por varios mecanismos de control. En la mayoría de los casos, la activación celular comienza con la interacción del ligando con el receptor correspondiente (por ejemplo, antígeno-receptor de linfocitos T, EGF-EGFR, IL-2-IL2R, etc.). La transducción de la señal se continúa en el interior celular con la activación de proteínas tirosincinasas (Fyn, Lyn, Lck, ZAP-70, etc.) que se encuentran acopladas a los dominios intracelulares de los receptores. La estimulación del receptor también puede involucrar la activación de la fosfolipasa C (PLC), que hidroliza al fosfatidilinositol bifosfato (PIP_2) y genera inositol trifosfato (IP_3), que moviliza iones Ca^{++}, y diacilglicerol (DAG), que a su vez activa a la proteincinasa C (PKC). La inducción de tirosincinasas y PKC activa a los miembros de la familia de Ras (Ash, Grb2, Ras, Sos, etc.), los cuales transmiten la señal al núcleo a través de la activación de proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPKK, MAPK, JNKK, JNK), y se lleva a cabo la activación transcripcional de muchos genes a través del reconocimiento de elementos de respuesta específicos, como, p. ej., AP-1 y SER.

Otra vía de transducción es la de adenilatociclasa (AC), que está asociada a receptores que producen AMPc al ser activados. El AMPc activa la proteincinasa A (PKA) para generar la proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc (CREB). En las situaciones donde existe daño genético se induce a *p*21 a través de la forma activa de *p*53. Entre las funciones de *p*21 se encuentra la disociación de los complejos CDC-ciclina y, en consecuencia, interrumpe el ciclo celular. La formación de los complejos CDC2-ciclina-E activos disocia a los complejos pRb-E2F liberando a E2F, lo cual influye en la activación transcripcional y en la progresión del ciclo celular.

Existe una estrecha asociación entre el proceso de activación celular y los puntos de control del ciclo celular. Los puntos de control en la transición de la fase G_1 a la fase S y de la fase G_2 a la fase M son importantes en la

www.elsolucionario.org

protección de las células de fuentes exógenas de daño al DNA. Sin embargo, este daño puede ser causado por procesos celulares intrínsecos, como el rearreglo de genes durante el desarrollo, senescencia celular y muerte celular por apoptosis. Cuando el daño es generado por procesos intrínsecos, los puntos de control sobre la proliferación celular son importantes en la prevención de la evolución de células normales a cancerosas. Se ha informado una asociación entre el aumento de edad, incidencia de cáncer, incremento de daño al DNA debido a una exposición acumulada de agentes que lo dañan y disminución de la capacidad de reparación del DNA. Por otra parte, los estudios de senescencia celular han revelado una importante fuente de daño celular intrínseco. Los fibroblastos humanos normales no expresan telomerasa; por lo tanto, los telómeros decrecen con la proliferación celular. Se ha sugerido que la senescencia celular está asociada a la pérdida de secuencias teloméricas, y que los cromosomas con telómeros cortos activan puntos de control que inhiben la proliferación celular. Las células senescentes tienen un aumento de aberraciones cromosómicas, con asociaciones telómero-telómero, por lo que el programa senescente normal puede generar inestabilidad genómica. Un gen necesario para interrumpir la proliferación en células senescentes es *p*21 (WAFI/CIPI/SDII), cuyo producto se une a los complejos CDC-ciclina e inhibe sus funciones. La pérdida de *p*21 causa inestabilidad genómica.

Durante el rearreglo de genes de inmunoglobulinas (Ig) y del receptor de linfocitos T (TCR) se generan rupturas del DNA, y hay proteínas que inhiben la progresión del ciclo celular durante estos procesos. Por lo tanto, los genes que codifican estas proteínas son blancos potenciales para mutaciones que podrían generar inestabilidad genómica. Estas mutaciones son importantes en la etiología de linfomas y leucemias. El escape de la interrupción de la proliferación celular, por mutación en genes que controlan la proliferación durante la apoptosis, induce la proliferación de células con inestabilidad genómica que estaban comprometidas a morir.

Por otra parte, el funcionamiento inapropiado del huso mitótico induce interrupción de la progresión del ciclo celular. Además, hay inhibición de un nuevo ciclo si la mitosis no fue completada en el ciclo previo debido a la inhibición del ensamblaje de microtúbulos. Las células cancerosas tienen un aumento en la resistencia a agentes antimicrotúbulos en relación con las células normales. La regulación de los centriolos ha sido menos estudiada; sin embargo, defectos en su duplicación inducen detención de la mitosis por medio de un punto de control. Por ejemplo, la expresión del antígeno T del virus SV40 en tejido pancreático murino produce anormalidades en el número y segregación de centriolos, y esto a su vez genera inestabilidad genómica. El producto del protooncogén *c-mos*, un regulador de la metafase meiótica, produce poliploidía cuando se expresa anormalmente en células mitóticas, así como durante la tumorigénesis.

Respecto a la transición de la fase G_2 a la fase M, ésta es inhibida por el daño y replicación alterada del DNA. Los puntos de control evitan la segregación de cromosomas alterados. Se han identificado pocos genes que controlan la transición de la fase G_2 a la fase M; sin embargo, los defectos en la regulación de los puntos de control que actúan en esta etapa pueden ser importantes en la tumorigénesis. Por ejemplo, se ha demostrado que la sobreexpresión de *Ras* normal o mutado promueve la formación de células multinucleadas y desórdenes mitósicos, lo que sugiere que Ras puede participar en la desregulación de la transición de la fase G_2 a la fase M del ciclo celular. Las células de individuos con predisposición a cáncer familiar muestran mayor frecuencia de rupturas cromosómicas después de la irradiación. Las células de pacientes con ataxia telangiectasia se detienen en la fase G_1 después de la irradiación. Líneas celulares derivadas de cánceres humanos interrumpen su progresión en la fase G_2 después del daño al DNA. Además, la expresión alterada de elementos que participan en la transición de la fase G_2 a la fase M, como las ciclinas A, B y de CDC2, se presenta en los mismos cánceres.

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

www.elsolucionario.org

Capítulo 7

Muerte celular. Apoptosis

Dolores Javier Sánchez González, Dairo Jesús Orjuela Henry, Luis Humberto Pérez Astudillo

INTRODUCCIÓN

La apoptosis es una muerte celular programada o suicidio celular controlado genéticamente. Esta forma de muerte es diferente de la muerte no apoptósica o muerte por necrosis. La apoptosis juega un papel importantísimo para el desarrollo embriológico de todos los tejidos y órganos. Dentro de la apoptosis es posible distinguir diversas fases: fase D1, en la que se produce la expresión de nuevos genes y proteínas que inducen la siguiente fase, o fase F, donde se produce la fragmentación del DNA y que es antesala de la fase D2, donde finalmente se produce la fragmentación de la célula en los denominados cuerpos apoptósicos. La apoptosis es inducida por p53 a través de la transcripción de genes como Bax. También c-myc, a través de la puesta en marcha de programas transcripcionales, puede inducir la apoptosis salvo en presencia de Bcl-2 o de factores de crecimiento (IGF-1, IL-3), que permiten la inmortalización o proliferación, o ambas; c-myc es un gen que codifica para una proteína con propiedades oncogénicas, pero que en su estado normal actúa tanto sobre la proliferación celular como sobre la apoptosis a través de la puesta en marcha de diferentes programas de transcripción de genes que serían activados a través de la estimulación de c-myc por diferentes mitógenos.

Algunos de estos mitógenos, como el factor de crecimiento semejante a la insulina (IGF-1) o la interleucina-3 (IL-3), son capaces de frenar los programas transcripcionales de la apoptosis y generar la proliferación. Por el contrario, Bcl-2 inhibe la apoptosis, al igual que otros genes homólogos como mcl-1 y Bcl-x. Más recientemente se ha descubierto la proteína BAG-1, una proteína antiapoptósica que colabora con Bcl-2.

Otros inductores de apoptosis son FAS/APO-1/ CD95. Se trata de dos anticuerpos monoclonales capaces de inducir la muerte celular programada y dirigidos contra los antígenos Fas y APO-1, que en realidad son el mismo y corresponden a receptores de membrana de los factores de necrosis tumoral (TNF) y de crecimiento nervioso (NGF). Su homología es en la región extracelular, y concretamente en una región de 70 aminoácidos muy conservada entre ambos que se conoce con el nombre de región o dominio de muerte. El ligando específico de Fas, FasL, es una proteína de membrana. Fas se expresa en muchos tejidos y particularmente en los linfocitos, donde induce la apoptosis una vez terminada la respuesta inmunitaria.

Por último, NF-$\varkappa$B es un factor de transcripción que produce la inducción de diversos genes celulares (citocinas y sus receptores) y que también podría tener un importante papel en la apoptosis. Cuando NF-$\varkappa$B produce heterodímeros p50/p65 se genera la activación de la transcripción de Bcl-2, pero no cuando se generan homodímeros p50/p50, que reprimen su expresión.

En todo caso, la apoptosis sería, de una manera u otra, producida a través de la activación de la enzima convertidora de interleucina-1beta (ICE), una cisteína proteinasa (caspasa), que produce la activación de endonucleasas, alteraciones de la membrana celular y reorganización del citoesqueleto. La activación de endonucleasas es dependiente de Ca^{++} y Mg^{++}, y genera la digestión enzimática (endonucleólisis) y, por lo tanto, los fragmentos de DNA. En este sentido es importante el papel de las enzimas fijadoras de calcio, como la calmodulina, que a través de la activación de la adenilatociclasa genera un

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

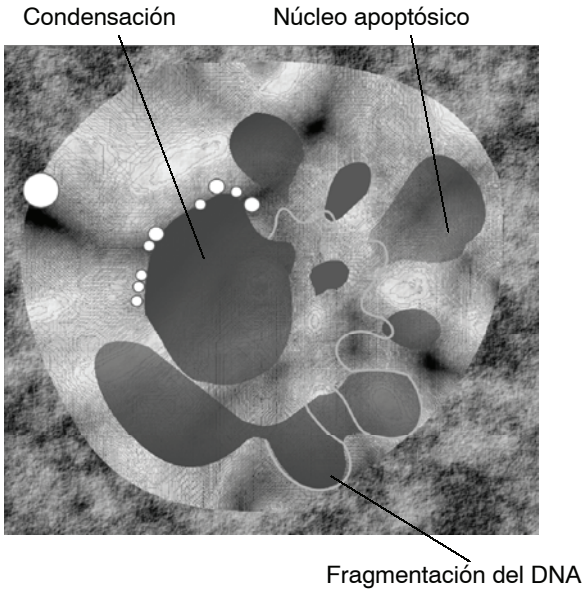


Figura 7-1. Apoptosis. Esquema de un núcleo celular en proceso de apoptosis. Se observa la fragmentación y condensación de la cromatina como cúmulos negros.

aumento de AMPc y de la actividad proteincinasa que generan la muerte celular.

Los mecanismos que regulan la muerte celular son esenciales para el desarrollo normal y mantenimiento de la homeostasia. Las células crecen de forma controlada gracias a la expresión de nuevos genes que inducen señales de muerte en estadios definidos de diferenciación, y en respuesta a estímulos fisiológicos determinados. En 1972 se introdujo el término griego *apoptosis*, por Kerr y col., que significa "caída de las hojas de un árbol o de los pétalos de una flor", para definir las características morfológicas particulares de un tipo de muerte celular fisiológica, programada genéticamente, que difiere de la muerte celular patológica o necrosis celular.

Se considera a la apoptosis como un mecanismo fisiológico de muerte (inherente al desarrollo celular), que se desencadena por diversas señales, las cuales pueden ser fisiológicas o por estímulos exógenos ambientales. Estas señales pueden actuar sobre receptores de superficie y causar la activación en cascada de proteínas citoplasmáticas; ello trae como resultado la activación de un programa genético que conduce, generalmente, a la nucleólisis por acción de endonucleasas. Este mecanismo de muerte celular interviene en importantes fenómenos fisiológicos, como embriogénesis, mantenimiento de la homeostasia, renovación tisular y desarrollo y funcionamiento del sistema inmunitario.

La apoptosis se ha conocido con otros nombres en el pasado, como cuerpos de Councilman (hígado), cuerpos cariolíticos (criptas intestinales), cuerpos tingibles (ganglio linfático), cuerpos de Civatte (piel), cuerpos hematoxilínicos (varios), etc.

La apoptosis es un fenómeno biológico fundamental, permanente, dinámico e interactivo. Existen mecanismos proapoptósicos o antiapoptósicos, regulados genéticamente, que actúan en forma activa (pues consumen energía) y equilibrada, como función necesaria para evitar la sobreproducción celular. Es un proceso ordenado y silencioso que no produce reacción tisular, y por ello es difícil de captar. En 1972, Kerr y col., estudiando organelos en células neoplásicas, detectaron que muchas células desaparecían en los cultivos. Esto llevó al estudio de imágenes cinemáticas, que mostraron las alteraciones que sufre la célula en un proceso que es de corta duración, demorando en tales cultivos menos de 1 h (figura 7-1).

CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS

Es una forma de muerte celular caracterizada por hipereosinofilia y retracción citoplasmática con fragmentación nuclear (cariorrexis) desencadenada por señales celulares controladas genéticamente. Estas señales pueden originarse en la célula misma o por la interacción con otras células. La apoptosis tiene un significado biológico muy importante, opuesto al de la mitosis, en la regulación del volumen tisular. La apoptosis contribuye a dar forma a los órganos durante la morfogénesis y elimina células inmunológicamente autorreactivas, células infectadas y genéticamente dañadas, cuya existencia es potencialmente nociva.

Al microscopio de luz, las células apoptósicas se observan como células pequeñas de citoplasma redondeado u oval, con material nuclear basófilo o sin él. El citoplasma en fases más avanzadas aparece fragmentado. La cromatina aparece como grumos basófilos densos. La fagocitosis de los cuerpos apoptósicos no induce a los macrófagos para que estimulen una respuesta inflamatoria.

Al microscopio electrónico (ME), en la fase temprana se observa condensación de la cromatina en masas densas, uniformes y bien delimitadas. El nucleolo presenta disposición periférica de la cromatina con formación de gránulos osmiofílicos hacia el centro del núcleo; el núcleo fibrilar proteico forma una masa granular compacta adosada a la superficie interna de la cromatina condensada. Los desmosomas aparecen desestructurados, y las estructuras de superficie como microvellosidades están desorganizadas. El volumen celular está disminuido y la densidad celular aumentada, los organelos

www.elsolucionario.org

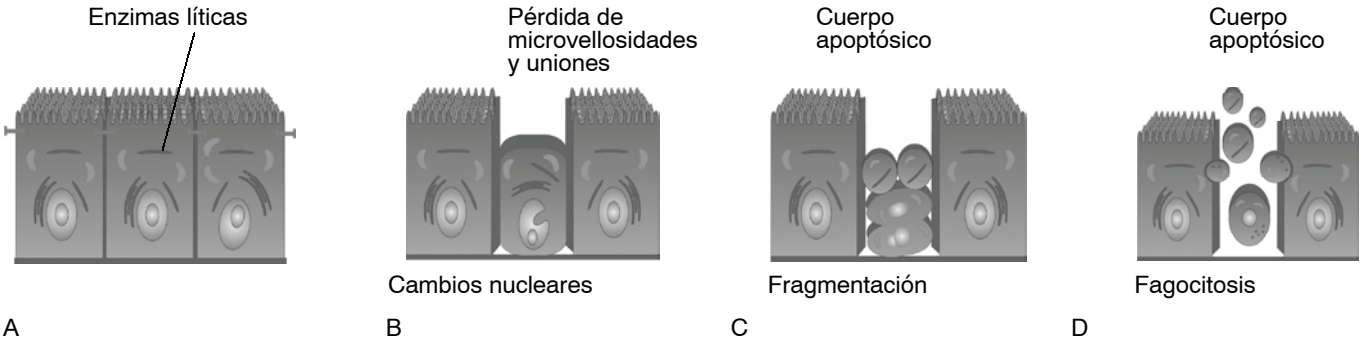


Figura 7-2. Esquema de la apoptosis o muerte celular programada. Este proceso celular es dependiente de energía; al realizarse de manera controlada, no afecta a las células en vecindad. ***A.*** Cuando comienza este proceso, se sintetizan enzimas líticas y se producen cambios estructurales, lo que se llama cebamiento. ***B.*** Las células pierden contacto con sus vecinas, su citoplasma y núcleo se retraen, y los cromosomas se fragmentan. ***C.*** Se forman los fragmentos apoptósicos por fragmentación celular recubiertos por membrana; el núcleo también se fragmenta. ***D.*** Las células vecinas fagocitan los cuerpos apoptósicos.

citoplasmáticos aparecen compactos y la silueta de la célula (citoplasma y núcleo) está distorsionada. En la fase avanzada, el núcleo se observa fragmentado y con condensación de la cromatina. En el citoplasma hay agregación de filamentos intermedios, formación de grumos de proteínas ribosomales, agrupación concéntrica del retículo endoplasmático rugoso; las células con abundante citoplasma forman prolongaciones muy prominentes. Finalmente, éstas se separan para formar los fragmentos denominados cuerpos apoptósicos. *In vivo,* estos cuerpos son rápidamente fagocitados por células epiteliales adyacentes, macrófagos e incluso células neoplásicas. Esta fagocitosis y degradación rápida puede explicar la ausencia de inflamación en este fenómeno. Esta secuencia de alteraciones ocurre muy rápidamente; la retracción citoplasmática y aparición de prolongaciones sucede en minutos, pero los cuerpos apoptósicos son digeridos en algunas horas. En la apoptosis, las alteraciones nucleares representan los cambios más significativos e importantes de la célula muerta, y los organelos permanecen inalterados incluso hasta la fase en que aparecen los cuerpos apoptósicos (figura 7-2).

En la apoptosis, el proceso afecta a determinadas células, no necesariamente contiguas, y no a todas en un área tisular. La membrana celular no se destruye, lo que impide el escape al espacio extracelular de su contenido, resultando un proceso "silencioso", sin inflamación. En el citoplasma se produce granulación fina, con conservación de algunos organelos, en especial las mitocondrias, que tienen un rol interactivo importante. A nivel nuclear, la cromatina se condensa formando cuerpos apoptósicos. La membrana celular se retrae sobre los fragmentos del citoplasma y núcleo. Finalmente, los macrófagos captan la célula en su totalidad impidiendo, en una acción impecable, que se produzca alarma en el resto del tejido. Se ha demostrado, al menos en tejidos epiteliales, que si algo de material apoptósico escapa a la acción de los macrófagos, es captado por células vecinas. La participación de células vecinas en este proceso se manifiesta además por su capacidad de enviar señales a la célula que debe morir, como mecanismo complementario al que desarrolla la célula misma cuando se determina molecularmente su autodestrucción. El proceso de apoptosis demora entre 30 y 60 min en células en cultivo. Las células más lentas son las hepáticas, que tardan en promedio 3 h en desarrollar apoptosis.

FASES

En la apoptosis pueden diferenciarse varias fases:

1. **Efectora:** adopción sin retorno del compromiso hacia la muerte. Se caracteriza por el aumento en el contenido de calcio (Ca^{++}) intracelular, que origina la activación de ciertos grupos enzimáticos (endonucleasas y proteasas-caspasas), junto con cambios en el citoesqueleto celular, produciendo cambios en el tamaño y forma celular.
2. **Degradativa:** se degradan los ácidos nucleicos y hay más cambios en la membrana celular. Los cuerpos apoptósicos son fagocitados por macrófagos, impidiendo la salida del contenido celular al exterior y evitando inflamación. En esta fase se activan las endonucleasas que se encargan de fragmentar el DNA; además, se producen cambios marcados en el citoesqueleto y se condensa la cromatina.

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

3. **Limpieza:** los macrófagos eliminan todas las células apoptósicas, sin que eso afecte al tejido circundante, atraídos por ligandos específicos.

NECROSIS Y APOPTOSIS

Dos formas de muerte celular son comunes en el organismo: necrosis y apoptosis. Las características morfológicas de ambas permiten, en la mayoría de los tejidos, establecer claras diferencias entre ellas. En la apoptosis destacan las alteraciones morfológicas del núcleo frente a las del citoplasma, a la inversa de lo que ocurre en la necrosis en general.

A diferencia de la apoptosis, la necrosis es una forma de muerte celular que resulta de un proceso pasivo, accidental, y que es consecuencia de la destrucción progresiva de la estructura con alteración definitiva de la función normal en un daño irreversible. Este daño es desencadenado por cambios ambientales como isquemia, temperaturas extremas y traumatismos.

En la necrosis se observan numerosas células vecinas sometidas a este proceso, cubriendo una extensión variable con desintegración. La destrucción de la membrana celular permite el escape al exterior de elementos tóxicos que provocan un proceso inflamatorio que tendrá efecto nocivo en el organismo, según la extensión del proceso.

La cromatina sufre una dispersión irregular. Las causas son agentes tóxicos, traumáticos e hipóxicos, pero siempre patológicos (figura 7-3).

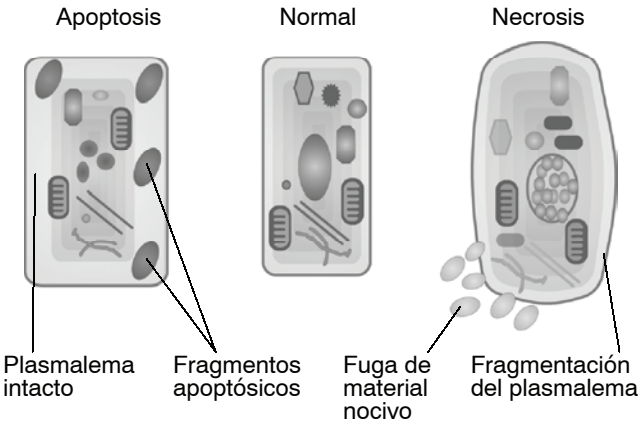


Figura 7-3. Apoptosis y necrosis, esquema comparativo. A la izquierda, cambios celulares de apoptosis con cuerpos apoptósicos y conservación de organelos hasta estadios avanzados del proceso. Centro, célula normal. A la derecha, signos de necrosis;

TUNEL

En la apoptosis la fragmentación rápida y regular del DNA es característica. Hay fragmentación inicialmente en trozos de 300 pares de bases (pb) y luego de 50 pb. con división del DNA internucleosomal de doble hebra. Esto origina fragmentos de 186 pb. y múltiplos de ellos (multímeros), lo cual se observa en electroforesis en gel de agarosa, como el llamado "patrón en escalera". La fragmentación se produce por activación de endonucleasas dependientes de Ca^{++}.

Muchos de los cambios celulares se atribuyen a la acción de enzima convertidora de interleucina 1b y granzima B. La transglutaminasa tisular produce agregados proteicos subplasmalemales, que evitan la liberación de enzimas intracelulares lesivas. El estudio e identificación específica de cuerpos apoptósicos se ha logrado con tinciones derivadas de la uridina. Aparece en publicaciones en inglés con el nombre de TUNEL, en el que la U corresponde a uridina *(terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP -rhodamine nick end labelling)* (figuras 7-4 y 7-5).

Sin embargo, en algunas células como las neuronas, la uridina (dUTP) tiñe también tejidos necróticos perdiendo especificidad. En tales casos se recurre a anticuerpos monoclonales capaces de reconocer fragmentos de DNA integrados a los cuerpos apoptósicos. La imagen que da la apoptosis al microscopio electrónico se caracteriza por la presencia de fragmentos de cromatina agrupados en conglomerados globuliformes, granulación fina del contenido citoplasmático, persistencia de algunos organelos hasta el final del proceso, como las mitocondrias, e integridad de la membrana celular.

RELACIÓN DE LA APOPTOSIS CON EL CICLO CELULAR

Dado que la apoptosis actúa como oponente a la mitosis, es muy importante su relación con el ciclo celular. En el ciclo celular hay cuatro fases: mitosis, fase de control celular G_1, síntesis de DNA y fase de control G_2. La apoptosis puede iniciarse en el tercio final de G_1 para impedir que una célula dañada ingrese a la fase de síntesis, de manera que las mutaciones no se reproduzcan durante la replicación del DNA, ingresando así a la especie y en la fase G_2 para impedir que las células que no hayan llegado a la madurez entren en mitosis. De esta manera,

www.elsolucionario.org

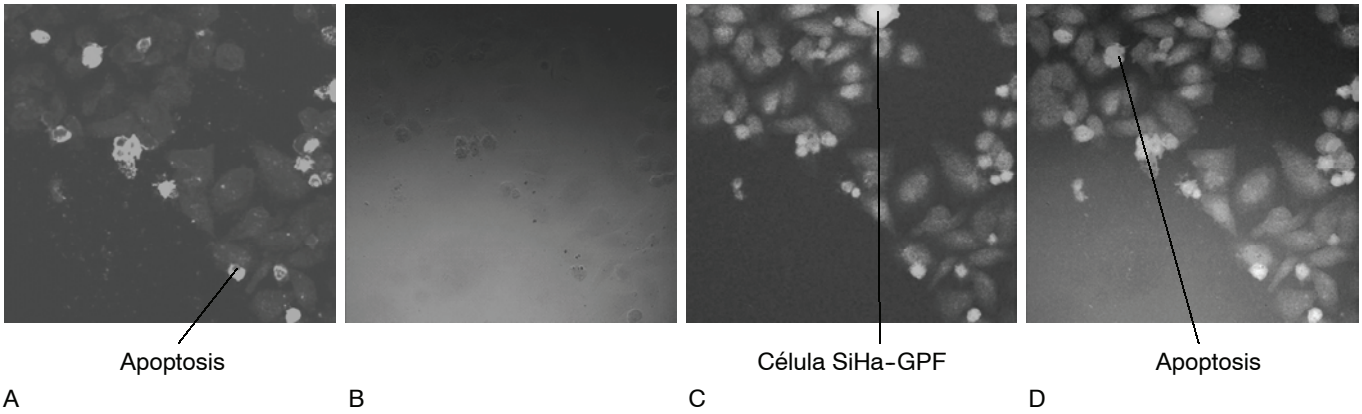


Figura 7-4. Imágenes de microscopia confocal de la línea celular SiHa co-transfectada con el gen E2 del virus del papiloma humano 16 (VPH 16) y el gen reportero de la proteína verde fluorescente (GFP), que garantiza la correcta transfección por la fluorescencia que emite. ***A.*** Células SiHa apoptósicas marcadas con la técnica de TUNEL *(terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-rhodamine nick end labelling technique*) mediante el *Cell Death Detection kit, TMR red;* Roche Applied Science. ***B.*** Células SiHa vistas en contraste diferencial de interferencias (DIC) Varell. ***C.*** Células SIHa fluoresciendo por la GFP. ***D.*** Colocalización de las células SiHa cotransfectadas que están sufriendo apoptosis (ver referencia 53, Ordóñez RM y col.).

durante el ciclo celular se determina cuándo debe entrar la célula en el proceso de autodestrucción o continuar el ciclo y dividirse. Se ejerce así un balance entre mitosis y apoptosis, regulando la población celular de cada tejido.

Existen señales de apoptosis que tienen su inicio en el núcleo, y esto se debe a que, en el contexto de un organismo pluricelular, una célula que ha adquirido por daños en el DNA un carácter neoplásico debe ser eliminada por apoptosis, ya que la desaparición de una célula no supone ningún perjuicio al organismo y en cambio su transformación sí lo hace. Existen en la célula mecanismos capaces de detectar daños en el DNA y discriminar entre las dos posibles respuestas celulares a estos daños. La reparación puede ser útil en el caso de células que se vayan a diferenciar de forma inminente perdiendo su capacidad mitósica (p. ej., células epiteliales), la apoptosis o la detención de la célula en los estadios G_1 y G_2 del ciclo, lo cual es una forma de muerte, ya que la célula queda genéticamente inhabilitada de manera irreversible. Las respuestas celulares a daños genéticos están mediadas por cinasas, de las que cabe destacar dos: ATM (*ataxia telangiectasia mutated gene*) y la cinasa dependiente de DNA, DNA-PK. Ambas dirigen una serie de respuestas entre las que se encuentran activación del ciclo, detención del crecimiento celular, reparación y apoptosis. ATM y posiblemente DNA-PK actúan sobre el factor de transcripción p53. Este factor se encuentra normalmente a bajos niveles, ya que es degradado

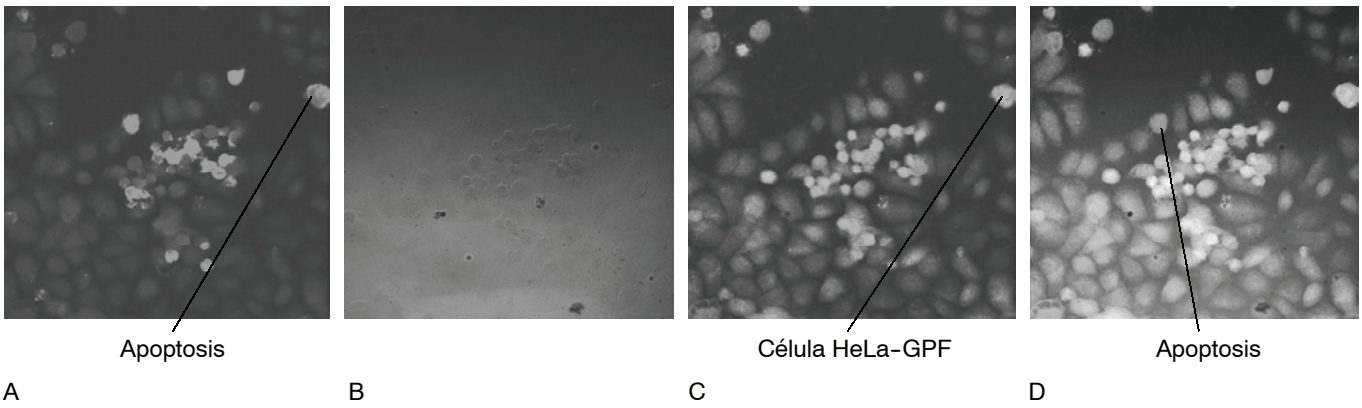


Figura 7-5. Imágenes de microscopia confocal de la línea celular HeLa cotransfectada con el gen E2 del virus del papiloma humano 16 (VPH 16) y el gen reportero de la proteína verde fluorescente (GFP), que garantiza la correcta transfección por la fluorescencia que emite. Se repitió el experimento mostrado anteriormente, pero con otra línea celular. ***A.*** Células HeLa apoptósicas marcadas con la técnica de TUNEL. ***B.*** Células HeLa vistas con Varell. ***C.*** Células HeLa fluoresciendo por la GFP. ***D.*** Colocalización de las células HeLa cotransfectadas que están sufriendo apoptosis (ver referencia 53, Ordóñez RM y col.).

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

por la proteína MDM2. El daño en el DNA induce fosforilación de p53 o MDM2; en el caso de MDM2, posiblemente por DNA-PK. La fosforilación inhibe la interacción de ambas proteínas y, por lo tanto, p53 se estabiliza, incrementando su expresión y activándose. La activación de p53 puede dar lugar a dos respuestas:

1. Apoptosis mediante un mecanismo que aún permanece sin determinar, pero en el que parece que influye la activación de genes proapoptósicos como *Bax* y otras moléculas.
2. Detención en el ciclo celular de forma irreversible mediante la inducción de p21, un inhibidor de la cinasa dependiente de ciclina (CDC).

Existen otros mecanismos, como transrepresión de genes antiapoptósicos y otros no transcripcionales.

HISTOFISIOLOGÍA DE LA APOPTOSIS

La apoptosis ocurre en desarrollo normal, diferenciación celular terminal, recambio celular normal en tejidos adultos, pérdida celular cíclica en tejidos maduros, involución, atrofia patológica en tejidos hormono-dependientes, traumatismo, regresión de hiperplasia, inmunidad celular, neoplasia, quimioterapia y toxinas.

Se denomina muerte celular programada porque algunas células aparecen como programadas a morir en un cierto momento como parte de la función o desarrollo normal de los tejidos; p. ej., en el desarrollo embrionario (deleción de órganos transitorios, conformación de órganos como en metamorfosis, fusión de fisuras y surcos como el paladar, etc.), recambio celular normal como en epidermis y maduración normal de células como linfocitos en centros germinativos de ganglios linfáticos (linfonodos).

Normalmente existe un equilibrio entre la reproducción celular y la apoptosis a fin de mantener la población adecuada en el momento en que los tejidos han llegado al estado adulto de desarrollo. Las células que mueren por apoptosis son:

1. Células defectuosas (mutadas, estructuralmente alteradas, etc.).
2. Células con defectos deletéreos (neoplásicas, infectadas, etc.).
3. Células sin función (membranas interdigitales en la embriogénesis).
4. Células formadas en exceso (neurogénesis).
5. Células que han completado su ciclo de vida (células viejas).

La división autosómica es permanente, con excepción de algunos grupos celulares como las neuronas y los cardiomiocitos. Durante el desarrollo embriológico, la reproducción celular es mayor que la apoptosis, aunque en ciertos momentos la segunda predomina cuando deben desaparecer tejidos, como las membranas interdigitales, branquias, elementos cloacales, etc., cuya persistencia forma alteraciones congénitas. Fisiológicamente, la apoptosis tiene un rol importante en las atresias, como sucede en la atresia folicular del ovario. La división somática produce en forma constante miles de millones de células nuevas, y para mantener la homeostasis tisular deben desaparecer alrededor de la mitad de ellas. Así, mitosis y apoptosis mantienen el equilibrio celular en los tejidos. La muerte del organismo humano es una tragedia, pero la muerte permanente de la mitad de sus células es esencial para su existencia

La apoptosis puede estar frenada, en equilibrio o estimulada. Por ejemplo, está frenada durante el desarrollo de espermatogonias, en las criptas de las glándulas intestinales (que son un epitelio de crecimiento rápido) y durante la lactancia, donde el tejido mamario aumenta su masa celular. Está en equilibrio respecto de la mitosis en los tejidos adultos sanos, y se ha observado en epitelios adultos normales de hígado, mama, corteza suprarrenal y tubo digestivo. Es muy significativo su rol homeostático en la médula ósea, donde debe destruir en forma permanente la mitad de una inmensa cantidad de células. Se estimula cuando existen células envejecidas, mutadas neoplásicas o no neoplásicas, alteradas por tóxicos y las que están en proceso de metamorfosis o atresia. Se ha estudiado esta condición en neutrófilos envejecidos, en megacariocitos con citoplasma agotado por producción excesiva de plaquetas, en la atresia folicular del ovario, en folículos pilosos en evolución y en la mama durante la involución poslactancia.

FAMILIAS DE MOLÉCULAS RELACIONADAS CON LA APOPTOSIS

Receptores de muerte

Las moléculas implicadas en el proceso de apoptosis que se han mantenido a lo largo de la evolución desarrollan un programa de apoptosis iniciado por señales que provienen del interior celular. Cuando la célula es potencialmente peligrosa para el sistema donde se encuen-

www.elsolucionario.org

tra integrada, se pone en marcha la maquinaria de apoptosis para eliminarla. Los mamíferos han desarrollado mecanismos para llevar a cabo esta forma de apoptosis, que es especialmente importante dentro del sistema inmunitario.

En la apoptosis instructiva tienen un papel fundamental los llamados receptores de muerte, situados en la superficie de la célula, y que reciben la señal de ligandos de muerte específicos para cada uno de ellos. Los receptores pueden dar la señal directamente a las caspasas en pocos segundos, disparando así el programa de apoptosis.

Los receptores de muerte pertenecen a la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral (en español, FNT, y en inglés, TNF) (TNFR1), cuyos miembros tienen en común un dominio extracelular rico en cisteína.

Otro rasgo común a todas estas moléculas señalizadoras de apoptosis es la presencia de una secuencia situada en su dominio intracitoplasmático, y que serviría para acoplar al receptor con el resto de la maquinaria apoptósica. La vía extrínseca o de receptores transmembrana establece conexiones con el espacio extracelular, recibiendo señales proapoptósicas desde el exterior y de las células adyacentes.

Existen dos familias de receptores de muerte (figura 7-6):

1. Proteína CD95 (APO-1/Fas).
2. Receptor 1 del factor de necrosis tumoral (TNFR1), o p55.

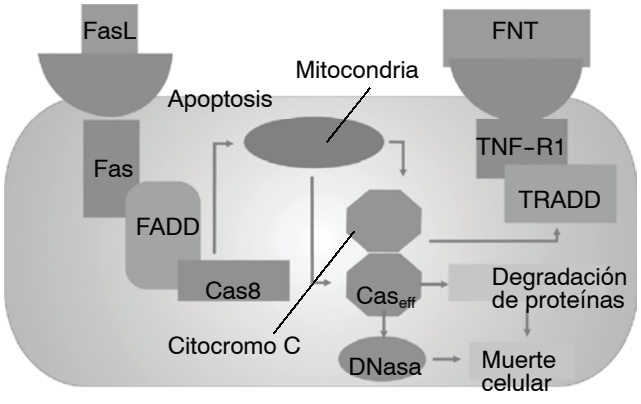


Figura 7-6. Esquema de la vía de receptores transmembrana (vía extrínseca de apoptosis). Se muestran las dos familias de receptores de muerte: proteína CD95 (APO-1/Fas) y receptor 1 del factor de necrosis tumoral (TNFR1). Estas vías establecen conexiones con el espacio extracelular recibiendo señales proapoptósicas desde el exterior y activan el sistema de caspasas efectoras (Caseff) para inducir la apoptosis.

Proteína CD95 (APO-1/Fas)

Esta proteína fue identificada inicialmente mediante un anticuerpo dirigido contra ella y que define un antígeno presente en la superficie de células como linfocitos humanos B y T activados, algunas líneas tumorales de origen linfoide y otros tipos celulares, como los hepatocitos. La proteína transmembrana Fas en su porción intracelular enlaza con un factor intermedio denominado FADD *(factor associated death domain),* nombre que sólo señala que está comprometido con la zona de la molécula Fas que participa en la muerte celular, activando las caspasas 8 y 10. En cambio, si la parte interna de la molécula se asocia a otro factor llamado DaXX (*death associated protein 6*), se activan proteincinasas que estimulan el ciclo celular y mitosis. Esta vía Fas permanece inactiva hasta que se produce en su parte externa el enlace con un cofactor llamado ligando Fas, proteína que actúa como detonador que enciende la vía, en que sólo las caspasas están inactivas y el resto de la cadena está preparado para recibir el enlace exterior. Esta característica permite actuar con rapidez sin necesidad de sintetizar otros factores (figura 7-7).

El anticuerpo contra CD95 se une a las células que lo expresan, provocándoles apoptosis *in vitro*. El gen que codifica para la proteína CD95 en humanos se localiza en la región q23 del cromosoma 10, y consiste en una serie de 9 exones interrumpidos por 8 intrones. El dominio extracelular de la proteína está formado por tres subdominios ricos en cisteínas, codificados por los exones 2, 3 y 4, mientras que la zona intracitoplasmática, incluida la región reguladora llamada dominio de muerte (en inglés, *death domain),* se encuentra en el exón 9.

El ligando fisiológico de CD95 se denomina CD95L, y es una proteína perteneciente a la familia del FNT. CD95 se expresa en la mayoría de los tejidos, mientras que CD95L se expresa predominantemente en linfocitos T, células asesinas naturales activadas (NK), así como de forma constitutiva en los tejidos que gozan de privilegio inmunitario dentro de las barreras especializadas (p. ej., barrera hematotímica y hematotesticular). Este patrón de expresión de ambas moléculas demuestra que deben tener implicación en una serie importante de procesos fisiológicos relacionados con el sistema inmunitario. Los procesos fisiológicos de apoptosis mediada por la pareja de moléculas CD95/CD95L son:

a. **Mecanismo efector de citotoxicidad por parte de linfocitos T y células NK.** Este mecanismo es mediado por perforina/granzima B. Existen órganos, como el ojo o los testículos, cuya estructura no podría soportar los efectos de una res-

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

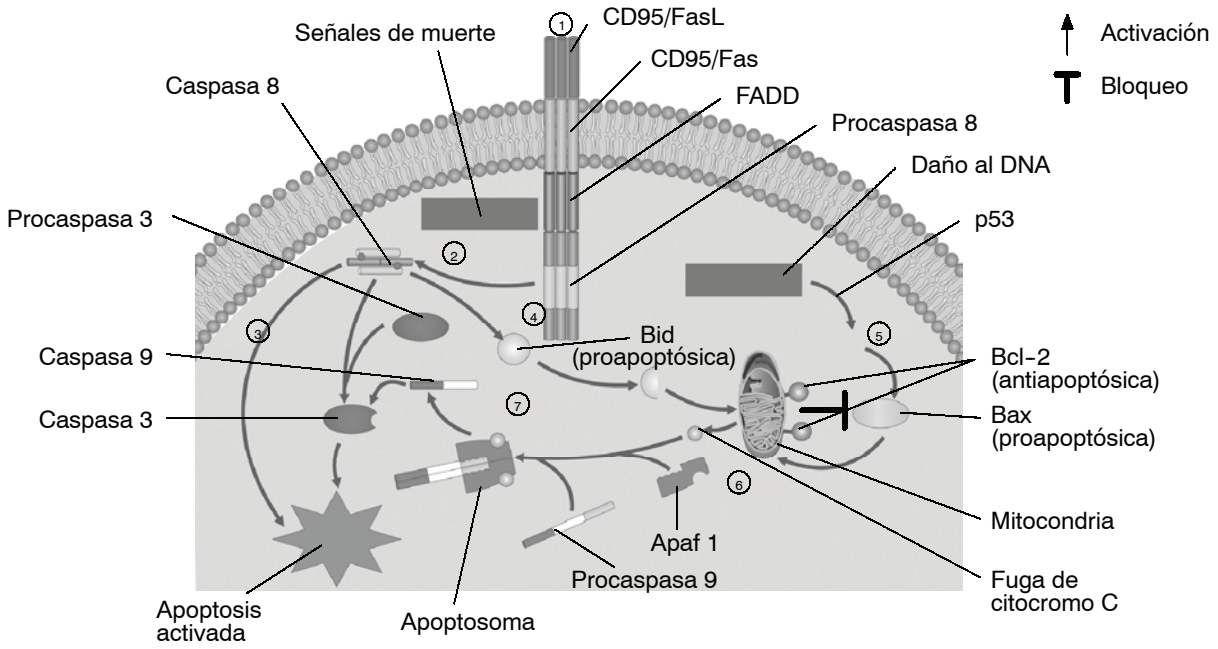


Figura 7-7. Cascada de señalización de la proteína CD95 (APO-1/Fas) para inducir la apoptosis. La proteína transmembrana Fas en su porción intracelular se une con un factor intermedio denominado FADD *(factor associated death domain),* el cual activa a la caspasa 8 que inicia la maquinaria inductora de apoptosis en la célula. Se esquematizan los procesos desde la activación (1) hasta la formación del apoptosoma (7).

puesta inmunitaria y su proceso inflamatorio asociado. Estos tejidos están aislados de estos procesos y se conocen como sitios de privilegio inmunitario. Se pensaba que este "privilegio" se mantenía evitando la entrada de células activadas en ellos. Recientemente se ha propuesto otro mecanismo de conservación del privilegio inmunitario. Las células activadas pueden entrar en estos tejidos pero, una vez allí, son eliminadas por apoptosis vía CD95. Esto se confirmó con el hallazgo de una expresión constitutiva de CD95L en el epitelio y endotelio de la córnea y el iris, en las células ciliares del ojo, así como en las células de Sertoli en el testículo.

b. **Modulación negativa de la respuesta inmunitaria.** Ocurre mediante la muerte por apoptosis de las células T activadas después de realizada su función, y de esta manera se evita su acumulación. También se presenta en la eliminación de clones de linfocitos B autorreactivos.

Receptor 1 del factor de necrosis tumoral (TNFR1)

Algo similar sucede con el otro receptor de membrana de FNT (en inglés, TNF) también conocido como p55 o DC120a. Su porción intracelular conecta con complejos intermedios como el Tradd *(TNF receptor associated death domain)* y Raidd *(receptor associated interleukine death domain),* que activan caspasas iniciadoras de apoptosis. Pero si se asocian a otro complejo llamado TRAF (TNF: *receptor associated factor),* activan proteincinasas y estimulan la proliferación celular; es decir, se produce el efecto contrario.

El receptor 1 de FNT es una proteína de 55 kDa y se expresa en la mayoría de los tipos celulares. Esta proteína da nombre a la familia en la que está integrada; por lo tanto, comparte con CD95 los tres subdominios ricos en cisteínas situados en la zona extracelular. El ligando de TNFR1 es el FNT, una citocina producida principalmente por macrófagos activados y células T en respuesta a infecciones.

A diferencia de la pareja formada por CD95/ CD95L, el par TNFR1/TNF es capaz de trasmitir a la célula dos tipos de señales muy distintas entre sí:

a. **La unión TNFR1/TNF puede dar lugar también a una señal de apoptosis.** La señalización de apoptosis por medio de TNFR1 es mucho más limitada que la mediada por CD95. En el caso de TNFR1, la unión de su ligando sólo señaliza apoptosis en algunos tipos celulares, y únicamente cuando la síntesis de proteínas ha sido bloqueada; por esto se cree que debe existir en las células algún factor que bloquee las señales de

www.elsolucionario.org

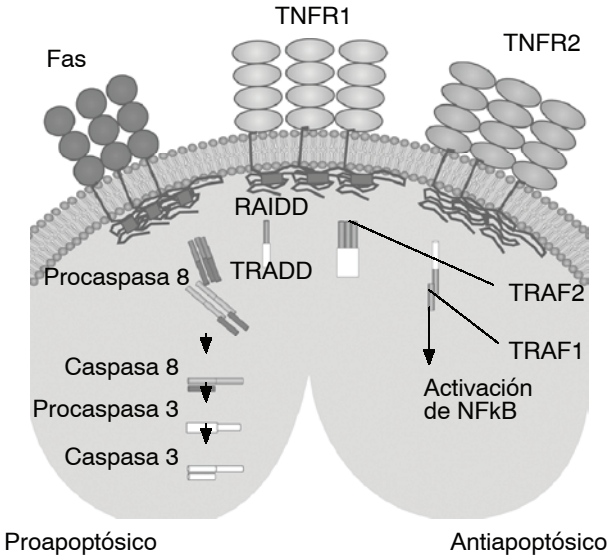


Figura 7-8. Esquema de la señalización de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral (FNT). La señalización mediada por el receptor 2 (TNFR2) activa la expresión de genes de respuesta inmunitaria tipo Th-1 a través del factor de transcripción NFκB. Este sistema es antiapoptósico. Por otra parte, la señalización mediada por el receptor 1 (TNFR1) es proapoptósica, ya que la porción intracelular de este receptor conecta con complejos intermedios como el TRADD *(TNF receptor associated death domain)* y el RAIDD *(receptor associated interleukine death domain),* que activan caspasas iniciadoras de apoptosis.

apoptosis derivadas de TNFR1. La expresión de este factor está probablemente controlada a través del factor nuclear de transcripción kappa B (NFκB) y JNK/AP-1.

b. **La unión del FNT a su receptor TNFR1 activa a los factores de transcripción NFκB y AP-1.** Este mecanismo da lugar a la expresión de genes de carácter proinflamatorio e inmunomodulador (figura 7-8).

Las alternativas de una misma vía de activar o de bloquear la apoptosis se repiten en los siguientes mecanismos:

DR3 o Apo-3

El receptor DR3 *(death receptor 3)* es muy similar en cuanto a su secuencia a TNFR1. Cuando se une a su ligando Apo3L, da lugar también a una doble señal que puede llevar a la activación de NFκB o a la muerte por apoptosis de la célula. Las moléculas que median ambas vías de la señalización son también las mismas que en el caso de TNFR1. El único aspecto en que existen diferencias entre ambas rutas de señalización es la expresión tanto de receptores como de ligandos. El gen de Apo3L se expresa de forma constitutiva en muchos tejidos, mientras que la expresión de DR3 se induce por la activación de linfocitos T. De forma inversa, TNFR1 se expresa de forma ubicua, mientras que el ligando se expresa sólo en linfocitos y macrófagos activados. Esta diferencia sugiere distintas funciones biológicas para ambas vías señalizadoras.

DR4 y DR5

DR4 y DR5 (PIDD) son receptores de muerte cuyo ligando, llamado *TNF related apoptosis inducing ligand* (TRAIL o Apo2L) es el que muestra más similitud con CD95L, aunque, a diferencia de esta molécula, su mRNA se expresa constitutivamente en gran cantidad de tejidos, y la expresión se eleva en linfocitos T de sangre periférica cuando éstos son estimulados. La señal a través de Apo2L produce apoptosis en una gran variedad de líneas tumorales. Se ha descrito también en una subpoblación de células T maduras un aumento de la apoptosis mediada por Apo2L al tratar éstas con interleucina 2 (IL-2). Esto puede sugerir un posible papel de estos receptores en la eliminación periférica de linfocitos T. Otro posible papel de la apoptosis mediada por Apo2L es la eliminación de células infectadas por virus. La señal de apoptosis mediada por estos receptores puede ser regulada mediante una familia de receptores señuelos *(decoy),* DcRs, que protegen a la célula de la apoptosis provocada por la unión de TRAIL. Uno de los miembros de esta familia es DcR1 (TRID, TRAIL-R3 o LIT), una proteína ligada a la superficie celular por una unión glicosil fosfatidil-inositol (GFI), que se asemeja a la porción extracelular de DR4, pero sin poseer ningún dominio intracitoplasmático. DcR1 es capaz de unirse a TRAIL. DcR2 (TRAIL-R4 o TRUNDD) es también un receptor homólogo de DR4 y DR5 con el dominio intracitoplasmático truncado. Se ha demostrado que tanto DcR1 como DcR2 compiten con DR4 y DR5 por la unión de TRAIL, dificultando así que la señal de apoptosis sea transmitida a través de estos receptores.

Proteínas de la familia Bcl-2

En la vía intrínseca o mitocondrial uno de los mecanismos de regulación de la apoptosis más importantes es llevada a cabo por una familia de proteínas mitocondriales que cuenta con al menos 15 miembros en mamíferos, y que tiene como característica la homología de todos sus miembros con Bcl-2, que fue la primera que se describió. Las moléculas de esta familia tienen su equivalente en el sistema de *C. elegans;* una de sus pro-

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

teínas encargadas de llevar a cabo el programa de apoptosis, CED-9, muestra gran similitud tanto estructural como funcional con Bcl-2, impidiendo la activación de la caspasa CED-3 por CED-4; la proteína CED-3 es efectora de la apoptosis. La descripción del primer miembro conocido de la familia, Bcl-2, se realizó al estudiar el punto de corte en la translocación T, presente en 85% de los linfomas foliculares de linfocitos B humanos. Esta translocación movía a un protooncogén, al que se denominó Bcl-2, desde su posición normal en la región cromosómica 18q21 hasta el *locus* de la cadena pesada de la inmunoglobulina en la región 14q32. Esto colocaba a Bcl-2 bajo las órdenes del promotor de la cadena pesada de inmunoglobulina, desregulando su transcripción y dando como resultado la sobreexpresión de Bcl-2 en las células de linfoma. A partir de la descripción de esta proteína tuvieron lugar otras muchas descripciones de moléculas que guardaban homología con ésta y que tenían carácter antiapoptósico o proapoptósico. Lo que identifica a todas estas proteínas como miembros de una sola familia es la presencia en su estructura de al menos una de cuatro secuencias consecutivas que se numeran de BH1 a BH4. De estos dominios parece que BH3 está directamente relacionado con una función proapoptósica y el resto de ellos con una función antiapoptósica. La estructura que presentan está también condicionada por la presencia de estos dominios. BH1, BH2 y BH3 forman una α-hélice en cada uno de ellos, y cuando están presentes en la misma molécula, por ejemplo Bcl-x, pueden formar una hendidura hidrofóbica en la cual podría encajar la α-hélice formada por el dominio BH3 si se encontrara en otra molécula de la familia orientado hacia el exterior. Este dato estructural explica el importante papel que tienen en el funcionamiento de estas moléculas las homodimerizaciones y heterodimerizaciones que tienen lugar entre ellas y que pueden dar lugar a su activación o inactivación. De esta forma se crearía un equilibrio entre ellas en el que serían de vital importancia sus cantidades relativas. La heterodimerización no es necesaria para la actividad de los miembros antiapoptósicos de la familia y para los proapoptósicos del grupo Bax. Sin embargo, es muy importante para los miembros proapoptósicos del grupo BH3 que basan gran parte de su funcionamiento en la unión a las proteínas antiapoptósicas, alterando su actividad.

Bcl-2

Es la proteína prototipo de esta familia. Pesa 26 kDa y posee los cuatro dominios que la definen (BH1-BH4). Bcl-2 es una proteína integral de membrana y se encuentra en la cara citoplasmática de la membrana externa de la mitocondria, el retículo endoplasmático y la membrana nuclear.

Es en esas membranas, gracias a que puede formar una estructura similar a un poro, donde se desarrolla una de sus posibles funciones: disminuir la permeabilidad de la membrana mitocondrial para bloquear el escape del citocromo C; modificar el flujo de moléculas o pequeñas proteínas a través de las membranas e intervenir en la estabilidad de organelos como la mitocondria ante la existencia de posibles daños.

Su sobreexpresión puede evitar, o al menos retrasar, varias formas de muerte celular programada, como las inducidas por falta de factores de crecimiento, irradiación, glucocorticoides y múltiples drogas quimioterapéuticas.

En contraste, parece no influir en otros mecanismos de apoptosis como, p. ej., la señalización vía CD95 en la mayoría de los tipos celulares.

Bcl-XL

Es una de las proteínas más estrechamente relacionadas con Bcl-2, tanto en su estructura como en su función. Posee los cuatro dominios BH y su peso molecular es de 30 kDa.

Su sobreexpresión puede mediar una resistencia significativa a la muerte celular por apoptosis dependiente de deprivación de factor de crecimiento. Se ha estudiado la expresión del mRNA de esta molécula, y parece encontrarse en una gran variedad de tejidos, como el sistema nervioso central.

Esta distribución preferencial puede sugerir algunos de los papeles fisiológicos que desempeña la expresión de esta proteína. La expresión del mRNA de esta molécula en tejido neural adulto es alta y constitutiva, lo cual puede estar relacionado con la capacidad de este tejido de mantener la viabilidad celular posmitósica durante largos periodos de tiempo.

Bax

Su nombre deriva del inglés *bclz-associated X protein.* Esta proteína es uno de los miembros proapoptósicos más importantes de la familia. Le da nombre a la subfamilia Bax, su peso molecular es de 21 kDa y posee los dominios BH1, BH2 y BH3, aunque son BH1 y BH2 los que guardan una estrecha homología con Bcl-2. Bax está ampliamente expresado en los distintos tejidos y su sobreexpresión acelera la muerte en respuesta a distintas señales. Participa en los fenómenos mitocondriales de la apoptosis y lleva a cabo una forma de muerte celu-

www.elsolucionario.org

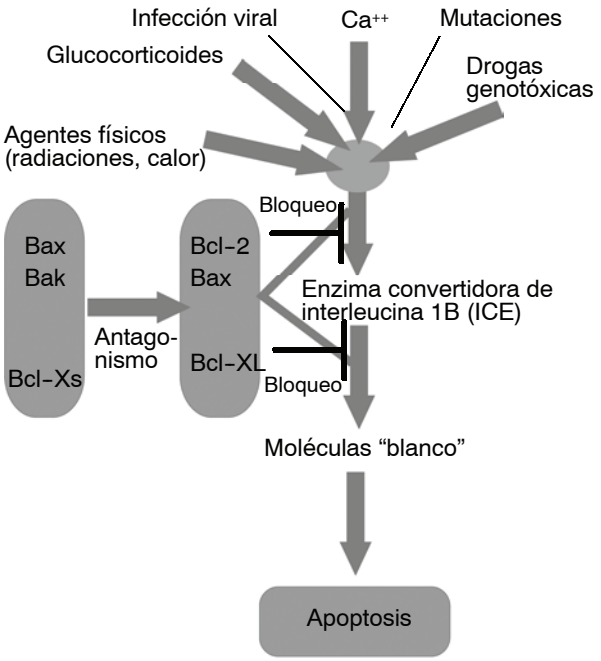


Figura 7-9. Regulación de la apoptosis por la familia Bcl-2. Se observa que el heterodímero Bcl-2-Bax y la variante Bcl-XL tienen efecto inhibitorio de la muerte celular, al impedir la acción de las cisteinproteasas (caspasas) que median señales de apoptosis, mientras que la formación de complejos Bax-Bak, así como niveles elevados de Bax o Bcl-Xs, favorecen la muerte programada de la célula. ICE = enzima convertidora de interleucina 1B.

lar programada independiente de muchos de los mecanismos de regulación y ejecución de este proceso. Esto parece estar relacionado con su capacidad para interaccionar con los canales que controlan la permeabilidad y el flujo iónico en la mitocondria (figura 7-9).

Miembros de la subfamilia BH3

Esta subfamilia está compuesta sólo por miembros proapoptósicos que, excepto por el dominio BH3, no muestran homología con Bcl-2.

Para ejercer su actividad, estas proteínas pueden formar heterodímeros con miembros antiapoptósicos de la familia. Para ello, el dominio BH3 de nueve aminoácidos de los miembros de este grupo puede introducirse en el hueco hidrofóbico formado por la asociación de las regiones BH1, BH2 y BH3 de los miembros antiapoptósicos.

Un ejemplo de la acción de esta familia de proteínas es la ejercida por dos de sus miembros: Bid (*BH3-Interacting domain death agonist*) y Bik (*Bcl2-interacting killer*) sobre la mitocondria, donde inducen la liberación de citocromo C y la apoptosis consecuente.

Vía de la ceramida o intrínseca mitocondrial

La ceramida es un glucolípido sintetizado en el RER y en las mitocondrias, cuya mayor concentración se ubica junto a la porción interna del plasmalema, que también contiene otro fosfolípido, la esfingomielina. Se ha determinado que agentes externos como la radiación ultravioleta (UV), agentes oxidantes y el calor activan la esfingomielinasa ácida, que provoca una reacción enzimática sobre la esfingomielina, aumentando la concentración de ceramida. Las vías Fas y FNT también tienen una acción activadora sobre la ceramida. La ceramida actúa sobre las mitocondrias, las cuales son el último organelo que desaparece en el proceso de apoptosis al ser fagocitado con los restos de la célula, y ejercen un papel proapoptósico o antiapoptósico.

La ceramida puede ser activada por factores externos a través de receptores de membrana y directamente por glucocorticoides. Además, las mutaciones no corregidas del DNA, como las oncogénicas, activan una proteína sintetizada por el gen p53, que provoca apoptosis a través de la activación de ceramida, con cambios iónicos entre la matriz de la mitocondria y el citosol. Esto produce un descenso del potencial transmembrana con aumento de la permeabilidad de su membrana interna, permitiendo el escape de citocromo C y de un factor inductor de apoptosis (AIF), que estimulan a las caspasas 8 y 10 e indirectamente a las 3 y 9, generando la apoptosis.

Familia de las caspasas

En el mecanismo molecular que controla la apoptosis actúan varios agentes, de los cuales uno de los más importantes y mejor estudiados es el complejo de cisteíno-aspártico proteasas denominadas caspasas. Se han descrito 11 caspasas en células humanas, que provocan una degradación proteica bien definida hasta llegar a la formación de cuerpos apoptósicos. Algunas caspasas son "iniciadoras" y otras "efectoras" del proceso catalítico, y actúan sobre endonucleasas, que son las responsables directas de la fragmentación del DNA.

La cadena de activación por corte proteica tiene sucesivos cortes dependientes de la ubicación del ácido aspártico que se repite en la estructura de la enzima. Se han descrito hasta 40 sustratos en la catálisis, proceso que en células cultivadas demora entre 30 y 40 min. La activación de las caspasas, que existen en calidad de procaspasas inactivas, se produce por diversas vías en que participan varios complejos moleculares.

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

El sistema de caspasas se ha mantenido a lo largo de la evolución y, tras su descripción en *C. elegans,* se encontró el equivalente en mamíferos gracias a la homología que presentaban ambas moléculas. La primera proteasa encontrada en mamíferos se denominó ICE *(interleukin-1b-converting enzime)* o caspasa-1 (cisteína-aspartasa-1); esta proteasa no tiene relación directa con el proceso de apoptosis, sino con el de la inflamación.

La familia de las caspasas en seres humanos tiene en común que se encuentran en forma de cimógeno o proenzima con una estructura bien definida:

a. La región catalítica está formada por dos dominios, uno grande (20 kDa) y otro pequeño (10 kDa), que darán lugar a las dos subunidades de la enzima una vez activada.
b. El dominio N-terminal es muy variable tanto en su secuencia como en su longitud, y tiene funciones de regulación y activación.

Las caspasas se dividen en dos grupos según la longitud de su región reguladora N-terminal o prodominio. Las caspasas con prodominio largo, como la 1, 2, 4, 5, 8 y 10, parecen estar involucradas en funciones de regulación de la activación de la cascada. Las procaspasas 8 y 10 contienen en sus largos prodominios repeticiones de una secuencia de interacción proteína-proteína llamada dominio efector de muerte o DED *(death effector domain),* y las procaspasas 1, 2, 4, 5 y 9 contienen dominios de reclutamiento de caspasas o CARDs *(caspase recruitment domains).* La presencia en su estructura de estas secuencias, unida a su localización cercana a la membrana plasmática, hace posible su reclutamiento hacia el complejo formado en torno a receptores de superficie señalizadores de apoptosis, como CD95 y FNT, activándose allí y dando lugar al comienzo de la cascada de proteólisis. Por esta razón se conocen como caspasas iniciadoras. El otro grupo está compuesto por las caspasas con prodominio corto, como las caspasas 3, 6 y 7. Éstas parecen estar situadas río abajo *(downstream)* en la cascada y se activan por alguna de las caspasas iniciadoras. Las caspasas efectoras son las que actúan al final de la cascada, proteolizando los componentes celulares. Las caspasas realizan su función enzimática de forma específica y eficaz; cortan una cisteína precedida por un ácido aspártico cuando en el sustrato existe una secuencia de reconocimiento compuesta de cuatro aminoácidos y que varía significativamente entre las diferentes caspasas. Además, es necesario que la proteína sustrato posea también una estructura terciaria que le permita ser reconocida por las caspasas. Todas las caspasas se activan por proteólisis y cumplen todas las condiciones para que esta activación sea llevada a cabo por otras caspasas. Una de estas moléculas activa a la otra cortando entre sus dominios; de esta forma, el prodominio se pierde y la enzima activa queda formada por un heterodímero compuesto por la subunidad grande y la subunidad pequeña. Ambas subunidades aportan al sitio activo residuos encargados tanto del reconocimiento de sustrato como de la catálisis. A la hora de actuar, las caspasas lo hacen en forma de tetrámero, dos unidades enzimáticas que se unen entre sí manteniendo independientes ambos sitios activos.

Este proceso de activación puede permitir a las caspasas realizar su función con un efecto cascada que se va amplificando a sí mismo desde que se da la señal de inicio. La señal que determina la primera autocatálisis activadora que disparará el sistema se debe a la sobreexpresión de determinadas procaspasas que se agrupan y se autoactivan.

Las caspasas iniciadoras se encuentren como monómeros en bajas concentraciones, y la molécula adaptadora unida al receptor de muerte las une propiciando su autocatálisis.

El modelo de autocatálisis facilitada postula que las caspasas se encuentran en la célula formando complejos con una conformación tal que bloquea su autocatálisis. Un cofactor actuaría facilitando la activación, cambiando la conformación de la misma o liberando un inhibidor del complejo formado, de forma que se active la autocatálisis de la proteína y el comienzo de la señal apoptósica.

En cuanto a los sustratos celulares sobre los que actúan las caspasas, éstos son un número determinado de proteínas que son cortadas de manera coordinada con la finalidad de hacerles perder su función o modificársela, de tal manera que la organización celular se altere para que la célula muera.

La proteólisis de sustratos por parte de las caspasas produce los siguientes efectos:

a. Degradan moléculas implicadas directamente en la estructura celular, como la cinasa de adhesión focal o FAK *(focal adhesion kinase)* y la cinasa 2 activada por p21, modificando su actividad.
b. Degradan moléculas implicadas en proteger a la célula del proceso de apoptosis, como es el caso de ICAD/DFF45, la molécula que mantiene inhibida a la carbamoxil fosfato sintetasa/aspartato transcarbamoilasa/dihidroorotasa (CAD), la nucleasa responsable de la degradación del DNA durante la apoptosis. Otras moléculas protectoras de la célula y que son degradadas por caspa-

www.elsolucionario.org

sas son algunos de los miembros antiapoptósicos de la familia Bcl-2. En el caso de estas proteínas, la proteólisis libera un fragmento que tiene poder proapoptósico por sí mismo. De esta forma, las caspasas realizan una retroalimentación positiva de su propio efecto.

c. Degradan proteínas relacionadas con la reparación en el DNA y con los procesos de replicación y transcripción del DNA (DNA-PKCS) o la poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP).

La actividad de las caspasas se detiene por la acción de sus inhibidores, igual que ocurre con otros sistemas proteolíticos.

Estos inhibidores son:

a. CrmA *(cytokine response modifier A)*. Es una molécula producida por el virus *cowpox* de la vaccinia que inhibe potencialmente las caspasas 1 y 8, y bloquea la apoptosis causada por el FNT, CD95, la provocada por la eliminación del suero u otros factores de crecimiento, así como la que se origina tras romper las uniones de las células con la matriz extracelular.

b. p35. Es una proteína de baculovirus que bloquea principalmente la apoptosis producida por infección viral. También existe una familia de proteínas inhibidoras de apoptosis (IAPs), las cuales realizan una potente inhibición selectiva de las caspasas 3 y 7.

La apoptosis se desarrolla por vías dependiente e independiente de caspasas

La muerte independiente de caspasas puede resultar del estímulo causado por la permeabilización de la membrana lisosomal (LMP) con la subsiguiente liberación de catepsinproteasas. La vía dependiente de caspasas tiene dos rutas principales:

a. La vía intrínseca involucra a MOMP, la cual resulta en el ensamblaje del complejo de activación de caspasas a través de caspasa 9 y de Apaf 1 (*apoptotic protease activating factor 1*) (el apoptosoma).

b. La vía extrínseca involucra la estimulación de miembros de la familia de los receptores del FNT, CD95 (Fas)-Apo1, TRAIL (receptores de muerte) (figura 7-10).

La activación del receptor de muerte típicamente se convierte en el reclutamiento y activación de caspasa 8 por las proteínas adaptadoras FADD y TRADD para formar DISC, la cual puede propagar la señal de muerte en dos vías:

a. Por proteólisis directa de efectores *downstream* de las caspasas, lo cual resulta en su activación.

b. Por proteólisis del dominio BH3 de la proteína Bid, la cual promueve el destino de la mitocon-

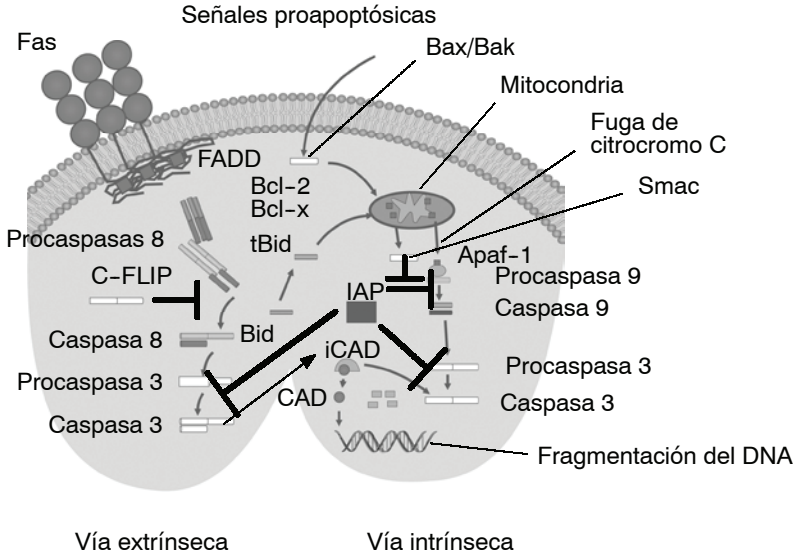


Figura 7-10. La apoptosis se desarrolla por vías dependiente e independiente de caspasas. La vía dependiente de caspasas tiene dos principales rutas: la vía extrínseca involucra la estimulación de miembros de la familia de los receptores de muerte, FNT, CD95 (Fas)-Apo1), mientras que la vía intrínseca involucra a MOMP, la cual resulta en el ensamblaje del complejo de activación de caspasas a través de caspasa 9 y de Apaf 1 (el apoptosoma).

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

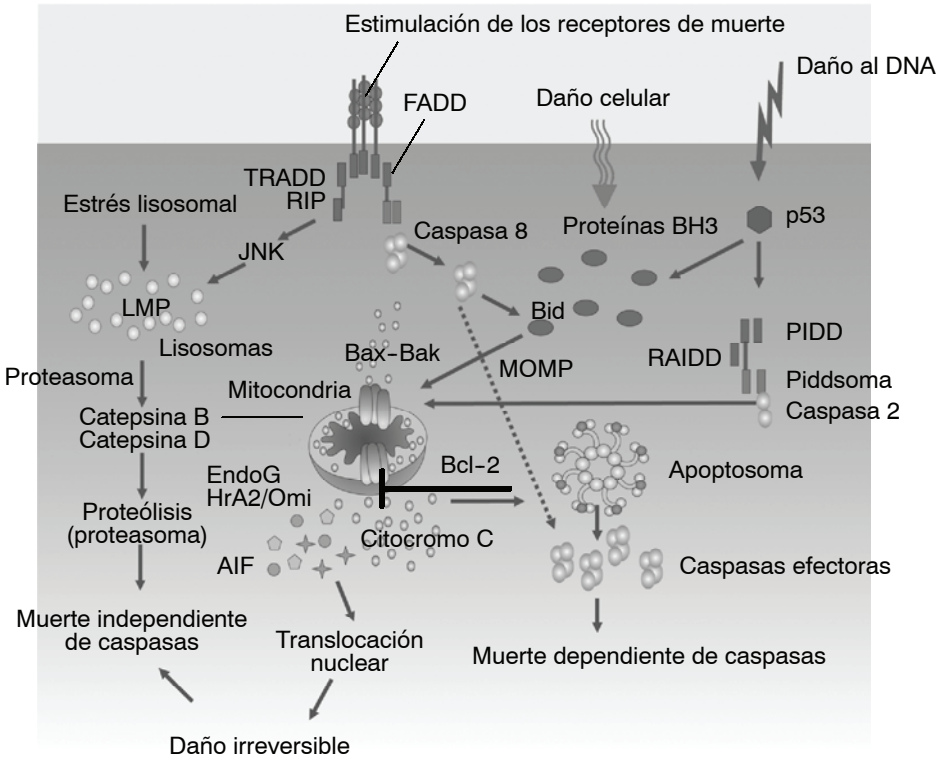


Figura 7–11. Esquema de los mecanismos de apoptosis, rutas dependiente e independiente de caspasas. La muerte independiente de caspasas resulta del estímulo causado por la permeabilización de la membrana lisosomal (LMP) con la subsiguiente liberación de catepsinproteasas. Las proteínas BH3 proapoptósicas son: Bad, Bim, Bik, Bmf, Blk, Hrk, Puma, Noxa, Bnip3 y Bid.

dria y de MOMP (*mitochondrial outer membrane permeabilization*).

En la vía intrínseca hay un rango de proteínas con dominios BH3 que sirven de centinelas para percibir estrés, daño o infección celular. Proteínas con dominio BH3 probablemente iniciadas por MOMP desencadenan la oligomerización de Bax o Bak (*Bcl-2 antagonist killer*), o de ambos, en la membrana externa de la mitocondria, formando un canal que permite el escape de múltiples proteínas del espacio intermembranal. En el daño al DNA, la estabilización de p53 puede resultar en la activación transcripcional de proteínas con dominio BH3, como Puma y Noxa, las cuales promueven la formación del canal Bax/Bak promovido por MOMP. Una ruta alternativa de apoptosis dependiente de p53 ocurre a través de la estimulación transcripcional de la proteína PIDD (*death domain containing protein*); PIDD puede promover el ensamblaje de ella misma con RAIDD y caspasa 2 (el piddosoma). No es claro cómo el piddosoma puede promover muerte celular, pero se propone que es a través de la vía de MOMP y caspasa 2. Algunas de las proteínas liberadas de la mitocondria debido a la señal de MOMP (AIF, HtrA2/Omi, endonucleasa G) pueden establecer un programa de muerte independiente de las caspasas (figura 7–11).

REGULACIÓN MOLECULAR DE LA APOPTOSIS

Dentro del proceso de apoptosis, todos los elementos se encuentran coordinados entre sí tanto física como funcionalmente, y desarrollan una gran variedad de rutas de iniciación en respuesta a muy diferentes estímulos y de puntos de regulación. En la vía señalizadora de apoptosis, que presenta una estructura reticular muy ramificada en sus inicios, y que después va confluyendo hacia rutas comunes para terminar en una o unas pocas, tienen especial importancia esos puntos de regulación. Existen algunos, situados al final de la red, donde se deciden acciones tan drásticas para la integridad celular que constituyen puntos de no retorno. La interacción existente entre la señal de apoptosis y la cascada de proteólisis mediada por caspasas se regula por una serie de proteínas, los adaptadores. Entre estos adaptadores se encuentran TRADD, FADD y Apaf-1.

www.elsolucionario.org

1. TRADD es el adaptador que se une mediante un dominio de muerte DD *(death domain)* a la región intracitoplasmática de los receptores de superficie TNFR1 y DR3, y actúa como plataforma de emisión de varias señales mediante su unión con otros adaptadores. La unión de TRADD con FADD, también por la región DD, media la activación de procaspasa 8. Además, TRADD puede unirse también al complejo formado por RIP (*receptor interacting protein*) (que posee también dominio DD) y TRAF2, dirigiendo la señal hacia la activación de NFκB.
2. FADD (Mort-1) es una proteína que sirve de puente entre procaspasa 8 y CD95. Para ello posee dos regiones de unión, que son las que distinguen a las moléculas adaptadoras. Por una parte, un dominio DD por el cual se une a una región homóloga presente en la región intracitoplasmática de CD95, y por la otra, un dominio DED *(death effector domain),* ejemplo particular del dominio CARD *(caspase recruitment domain)* de unión homotípica que poseen tanto las moléculas adaptadoras como las caspasas de prodominio largo y que, en este caso, le sirve para unirse a procaspasa 8. La pérdida de FADD, estudiada mediante ratones *knockout,* es letal en la etapa embrionaria, lo que muestra que FADD debe tener otras funciones de señalización críticas, además de servir de puente entre procaspasa 8 y CD95.
3. La proteína Apaf-1, homóloga de la proteína de *C. elegans* CED-4, actúa como molécula adaptadora a nivel de mitocondria, uniéndose a procaspasa 9 a través de un dominio CARD que posee en su extremo N-terminal. Apaf-1 tiene la capacidad de homodimerizarse, facilitando la agregación de la procaspasa. El papel de Apaf-1 es muy importante, como se demuestra en el efecto que su ausencia tiene en ratones *knockout,* que mueren durante la embriogénesis con graves alteraciones craneofaciales, sobrecrecimiento del cerebro y malformaciones oculares. Apaf-1 posee además otra región capaz de mediar su homodimerización y, por lo tanto, la unión de las procaspasas 9, lo que lleva a su autocatálisis y posterior activación.

El inicio de la señal de apoptosis puede encontrarse tanto fuera de la célula, en los receptores de superficie, como dentro de ella, respondiendo a estímulos de estrés celular a nivel de mitocondria o a disfunciones dentro del ciclo celular. Los receptores en la superficie de la célula, como CD95 y TNFR1, dan comienzo a la señal de apoptosis realizando un reclutamiento de procaspasa 8. Para ello, interviene la molécula adaptadora FADD, que en el caso de CD95 se une de forma directa, y en el de TNFR1 lo hace a través de la molécula intermedia TRADD (*TNFR-associated death domain).* La proteína FADD contiene un dominio DED que recluta varias subunidades de procaspasa 8. TNFR1 puede dar lugar también a la activación de otras procaspasas mediante la unión de otras moléculas adaptadoras, como RAIDD y RIP2, que contienen regiones CARD, el otro dominio de interacción proteína-proteína que sirve para el reclutamiento de procaspasas. A partir de esta activación se desencadena el proceso.

Apoptosis y mitocondria

Otro punto de inicio de la señal de apoptosis es la mitocondria (vía intrínseca de apoptosis). Este organelo tiene un papel muy importante dentro del proceso de apoptosis. Su función amplificadora de la señal iniciada por las caspasas asegura la culminación del proceso incluso ante la existencia de un reducido número de moléculas de proenzima que actúan como unidades iniciadoras. Asimismo, aporta a la ruta ejecutora de la apoptosis un sitio de regulación mediante las proteínas de la familia Bcl-2. Finalmente, en ausencia de caspasas, es capaz de mediar por sí sola una forma de muerte celular mucho más lenta y de características atípicas. Debido a esta fuerte implicación en el proceso, la mitocondria es uno de los organelos celulares que sufren numerosos cambios en su función, los cuales no se corresponden con cambios morfológicos, ya que la mitocondria mantiene su apariencia intacta durante todo el proceso, a diferencia de lo que ocurre en la necrosis.

La señal de muerte que parte exclusivamente de la mitocondria puede responder a una gran variedad de estímulos que impliquen estrés celular, algunas drogas, radiaciones, agentes oxidantes, sobrecarga de Ca^{++}, etc. Algunos de estos estímulos actúan directamente sobre la mitocondria y otros lo hacen a través de moléculas mediadoras, como las ceramidas, segundos mensajeros en la señalización de apoptosis y Bax, un miembro proapoptósico de la familia Bcl-2 muy importante en la apoptosis mediada por mitocondria. Los efectos de estas señales en la mitocondria se traducen en una serie de alteraciones en el buen funcionamiento del organelo. Se produce una liberación de citocromo C, ruptura de la cadena de transporte de electrones, liberación de iones superóxido y una hiperpolarización de la membrana interna que puede terminar con una expansión de la matriz y ruptura de la membrana externa de la mitocondria.

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

Otros efectos sobre la mitocondria son la inducción del poro mitocondrial, que quedaría permanentemente abierto, permitiendo la entrada de agua y solutos en la matriz con el consiguiente choque osmótico, y la liberación del factor inductor de apoptosis (AIF), el cual procesa procaspasa 3 *in vitro*. También la activación de Bax que puede formar, como otros miembros de la familia Bcl-2, un canal en la membrana de la mitocondria que, en su caso, en lugar de estabilizarla, como ocurre con los miembros antiapoptósicos de la familia, haría lo contrario. Existen dos vías de señalización de apoptosis donde interviene la mitocondria en el panorama de muerte celular:

1. La primera de las vías es por medio de MOMP *(mitochondrial outer membrane permeabilization),* que ocasiona la formación de un poro formado por las proteínas de la familia de Bcl-2, Bax y Bak, activadas por su dominio BH3 en respuesta a una señal de apoptosis, resultando en la liberación de proteínas del espacio intermembranal de la mitocondria incluyendo a citocromo C, *direct IAP binding protein with low pl* (Smac/DIABLO) y serinproteasa 25 (Omi/HtrA2). El citocromo C activa a APAF-1, la cual se oligomeriza y forma el apoptosoma, el cual activa a la caspasa 9. La caspasa 9 activa a las caspasas ejecutoras. El inhibidor de las caspasas (IAPs) bloquea la función de la caspasa 9 y es bloqueado por Smac y Omi.
2. La segunda ruta de muerte celular es desencadenada por especies reactivas de oxígeno (ROS), cambio en la permeabilidad de la membrana interna, provocando edema y ruptura de la matriz; este tipo de muerte provoca un proceso semejante a la muerte por necrosis. Mientras que las evidencias indican que estas dos rutas de apoptosis a través de la mitocondria son distintas, se cree que puede haber un traslape entre ellas (figura 7-12).

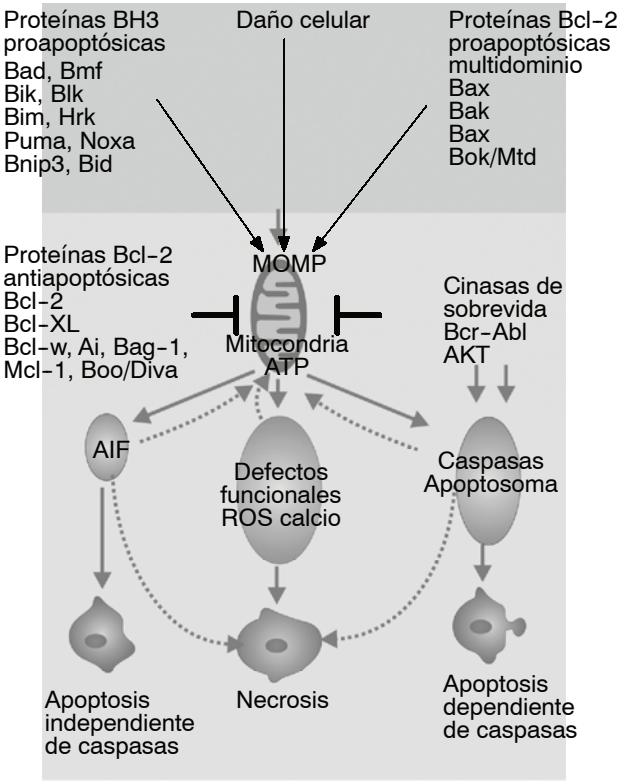


Figura 7-12. Esquema de las dos vías de señalización de apoptosis donde interviene la mitocondria en el panorama de muerte celular. La primera de las vías es a través de la participación de MOMP *(mitochondrial outer membrane permeabilization).* La segunda ruta de muerte celular es desencadenada por el cambio en la permeabilidad de la membrana interna provocando hinchazón y ruptura de la matriz, parecido a lo que pasa en la muerte por necrosis.

A nivel molecular, en la mitocondria se disparan mecanismos propios del programa de apoptosis, además de darse una serie de disfunciones en los procesos bioquímicos llevados a cabo en este organelo que pueden por sí mismos, a largo plazo, conducir a la célula a la muerte. Estos procesos son:

1. **Producción de especies reactivas de oxígeno.** Dentro de la cadena de transporte electrónico se estima que entre 1 y 5% de los electrones se pierden al participar principalmente en la formación de iones superóxido O_2^-. Al perder eficiencia la cadena de transporte durante la apoptosis se incrementa la formación de estos radicales libres. Aunque la formación tardía de estas especies y el desarrollo normal de la muerte celular en condiciones de anaerobiosis cuestionan su necesidad dentro del proceso, no existen aún bases suficientemente sólidas como para excluirlos de él.
2. **Desacople en la cadena de transporte de electrones,** así como una detención del metabolismo energético. Esta alteración se ha observado en apoptosis de timocitos producida por radiación ionizante y en la apoptosis vía CD95. La ceramida, un segundo mensajero implicado en la señalización de apoptosis, provoca la detención de la cadena en un punto determinado, tanto en células como en mitocondria aislada. Como consecuencia de esto se produce una caída en la producción de ATP, pero esto ocurre a largo plazo y no parece estar implicado en la inducción de apoptosis.
3. **Liberación de citocromo C.** Una gran variedad de agentes proapoptósicos inducen en la mitocon-

www.elsolucionario.org

dria la liberación de citocromo C. Esta molécula, cuya liberación es independiente de caspasas en la mayoría de los sistemas estudiados (excepto en la liberación inducida por CD95), es pieza imprescindible en el apoptosoma formado por Apaf-1 y procaspasa 9, y lo lleva a su procesamiento hasta dar lugar a caspasa 9 activa. La liberación de citocromo C en respuesta a estímulos proapoptósicos se inhibe por la presencia de Bcl-2.

4. **Fallo en el mantenimiento del potencial transmembranal.** El potencial mitocondrial transmembranal proporciona una distribución asimétrica de protones y otros iones en ambas caras de la membrana interna de la mitocondria, dando lugar a un gradiente tanto químico como eléctrico. Durante la apoptosis se ha observado una ruptura de este potencial como rasgo muy temprano. La causa de esta reducción del potencial transmembranal se produce por la apertura de un gran canal llamado poro de transición de permeabilidad (PT) mitocondrial. Este poro está formado por proteínas de la membrana interna, como el translocador de nucleótido adenina (ANT), y de la membrana externa, como la porina o canal aniónico voltaje dependiente (VDAC). Los componentes de ambas membranas se acoplan entre sí constituyendo un punto de contacto entre ambas membranas a través del cual pueden pasar moléculas de peso igual a 1.5 kDa. Su función es permitir la liberación de Ca^{++} al citoplasma y la entrada de proteínas importantes para mantener el potencial transmembrana hacia la matriz mitocondrial, mediante breves pulsos de apertura. Sin embargo, algunos estímulos inhibidores de apoptosis actúan sobre el poro, impidiendo su apertura. El lugar del poro PT dentro del programa de ejecución de la apoptosis se localiza corriente abajo *(downstream),* tanto de la liberación de citocromo C como de la activación de las caspasas. En cambio, tanto las caspasas como la proteína Bax facilitan su apertura permanente, lo que induce una nueva liberación de citocromo C y de un factor proapoptósico mitocondrial (AIF), que a su vez induce activación de caspasas. Esto sitúa al poro PT como lugar de amplificación de la señal de apoptosis. Independientemente de estos efectos, la apertura del poro PT puede dar lugar a una desregulación del volumen de la mitocondria por hiperosmolaridad en la matriz. Esto la llevaría a expandirse hasta romper la membrana externa, con la consiguiente liberación del contenido del espacio intermembranal al citosol.
5. **Formación de poros por las proteínas de la familia Bcl-2.** Como se expuso antes, la mayoría de los mecanismos apoptósicos que tienen lugar en la mitocondria están regulados por el equilibrio entre los miembros de la familia Bcl-2. Uno de los mecanismos de regulación de esta familia se basa en la formación de poros en la membrana.

Apoptosoma

En todos estos sistemas, el complejo formado por receptores, adaptadores Apaf-1 y procaspasa 9 se denomina apoptosoma. Es la formación de este complejo lo que da lugar a la activación de la procaspasa 9. En el caso de Apaf-1, para llevar a cabo el proceso de formación de este apoptosoma es necesaria la presencia de ATP y de citocromo C. De esta forma, la liberación de citocromo C por parte de la mitocondria puede mediar la activación de la procaspasa 9. Esta señal de activación puede venir de la mitocondria en sí misma como respuesta a distintas formas de estrés celular, o también puede formar parte de un bucle de amplificación de la señal mediada por receptores de superficie en la que interviene la mitocondria. En este bucle de amplificación interviene una proteína proapoptósica de la familia Bcl-2, Bid, que es procesada por caspasa 8 dividiéndose en dos fragmentos. Uno de ellos, el C-terminal, actúa sobre la mitocondria haciéndola liberar al exterior citocromo C, que activa el apoptosoma formado por Apaf-1 y procaspasa 9, llevándolo a su procesamiento. De esta forma, en la apoptosis mediada por receptor de muerte en la que existen pocos precursores de caspasa 8, la señal se amplifica mediante este sistema. Este punto de la red de señalización es susceptible de regulación por miembros antiapoptósicos de la familia Bcl-2, que inhiben el transporte de citocromo C al exterior y estabilizan la membrana mitocondrial. Por eso la apoptosis mediada por receptor no se afecta por proteínas de la familia Bcl-2, excepto en los casos en que en esta ruta tiene gran peso la amplificación llevada a cabo por Bid en la mitocondria (figura 7-11).

Genes que controlan la apoptosis

Los genes más estudiados que participan en el control de la apoptosis son: *Rb*, *p53*, *c-myc* y *Bcl-2*. El aumento de la proteína p53 se asocia a una detención del ciclo celular favoreciendo la reparación de DNA dañado, que de no ser posible termina con la eliminación de la célula.

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

El gen c-myc induce apoptosis, y aunque hay expresión aumentada, ésta pareciera no ser esencial para desencadenar por sí sola apoptosis.

La expresión de Bcl-2 confiere resistencia de las células a la apoptosis y así promueve la supervivencia celular, y por lo tanto favorece las mutaciones y la transformación neoplásica.

El factor frenador de la apoptosis más importante que se conoce hasta hoy es la familia de proteínas sintetizadas por el gen *Bcl-2* y similares. La familia de proteínas Bcl se sintetiza en la membrana de la mitocondria, ya que tales proteínas disminuyen la permeabilidad de la membrana hasta bloquear el escape de citocromo C y AIF. El *Bcl-2* es homólogo del protooncogén responsable del linfoma folicular humano.

Los factores proteicos del Bcl-2 se producen entre ambas membranas de la mitocondria. Los elementos sintetizados por este gen son: Bcl-2, BclXL, BclW y BRAG. De éstos, el BclXL ha sido cristalizado, lo que permite un mejor estudio de su estructura y acción. Estos factores son antiapoptósicos, pero mediante fosforilación originan proteínas con acción proapoptósica, como Bax, Bak, Bad y BclX5, ya que producen una caída del potencial transmembrana favoreciendo la liberación de citocromo C y AIF. Además, actúan como activadores de las vías proapoptósicas Fas y FNT y de algunas caspasas.

Apoptosis e inmunidad

La muerte celular programada es muy importante para el desarrollo y funcionamiento del sistema inmunitario, debido a que interviene en los eventos de formación del repertorio de células T y B, en los mecanismos de tolerancia central y periférica, en la eliminación de células autorreactivas, establecimiento de la memoria inmunitaria y en los mecanismos citolíticos de células asesinas naturales (NK) y linfocitos T citotóxicos.

El 95% de los timocitos son eliminados en el timo por mecanismos de apoptosis, proceso denominado selección negativa (deleción clonal), el cual elimina la existencia de clones T autorreactivos.

También en la médula ósea existe un proceso similar de deleción de clones B, autorreactivos en el estadio B inmaduro por entrecruzamiento de la inmunoglobulina de superficie en ausencia de señales coestimuladoras.

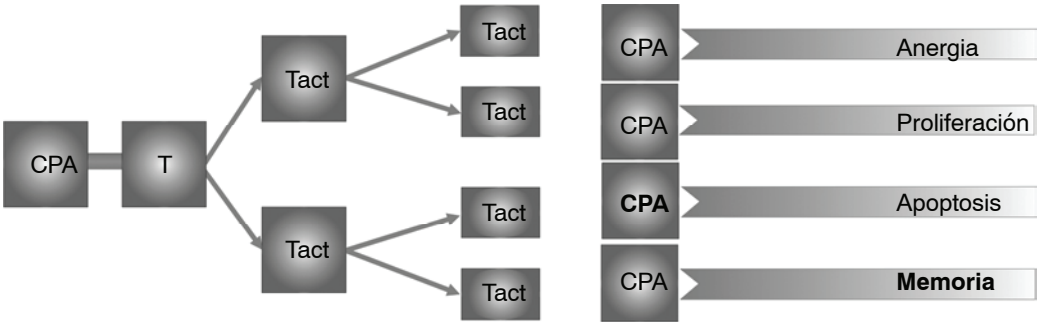
No obstante, la apoptosis no se restringe a células inmaduras; también los linfocitos T maduros pueden sufrir apoptosis. Entre los factores que pueden inducir apoptosis en células maduras están los glucocorticoides y las radiaciones gamma, la estimulación del complejo TCR/CD3 por anticuerpos monoclonales, antígenos (Ag) y por estimulación de los receptores CD2, Fas/Apo-1 y FNT. La sensibilidad para lograr la apoptosis es menor en linfocitos maduros y requiere previa activación. La ruta que siguen los linfocitos T al ser estimulados por las células presentadoras de antígenos (CPA) depende de una serie de elementos que determinan si la célula prolifera o si muere por apoptosis (figura 7-13).

CAMBIOS EN LA MEMBRANA PLASMÁTICA

La membrana plasmática de la célula es uno de los lugares donde se hacen más evidentes los efectos de toda la serie de modificaciones bioquímicas que constituyen la apoptosis. Esto hace que la célula adquiera un aspecto típicamente apoptósico, caracterizado por la disminución de tamaño, aislamiento respecto de las células que la limitan (en caso de que sea adherente) y el redondeamiento de su forma. Se generan también unas estructuras a modo de pequeñas evaginaciones esféricas surgidas de la membrana, que se denominan *blebs* y confieren a la célula un aspecto *boiling* (hirviente) al inicio del proceso, y *pop-corn like* (en forma de palomita de maíz) en los últimos estadios, cuando a los *blebs* se les han unido los cuerpos apoptósicos de tamaño mucho mayor y con contenido nuclear. Durante la apoptosis se produce una reorganización del citoesqueleto por la proteólisis de muchos de sus componentes y esto puede dar lugar a la formación de *blebs.*

En las células apoptósicas se producen también cambios en la simetría de los fosfolípidos de membrana. Esto no se puede apreciar con la simple observación de la célula al microscopio, pero se puede detectar también mediante la técnica de TUNEL. La bicapa lipídica que forma la membrana plasmática de la célula tiene una composición y orientación muy determinada. Bretcher fue el primero en describir, en 1972, la distribución asimétrica de los fosfolípidos que forman la bicapa; los que contienen colina, esfingomielina y fosfatidilcolina están orientados al exterior, mientras que la mayoría de los aminofosfolípidos, fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina están orientados hacia el interior. Esta orientación de la membrana no es un hecho estático, sino dinámico, en donde los fosfolípidos se mueven continuamente cruzando la membrana en ambas direcciones hasta conseguir el equilibrio que garantice la correcta arquitectura. En la estabilidad de ésta intervienen interacciones lípido-lípido, lípido-proteína y proteína-proteína, así

www.elsolucionario.org



Factores que influyen en la sensibilidad de la célula en reposo				Factores que influyen en las células T activadas	
Señales coestimulatorias B7-1, B7-2	◄	**Favorecen proliferación**	►	Señales coestimulatorias Baja dosis de antígenos Ciclo celular	
Estimulación del CD4, antígenos Citocinas (IL-2) Receptores de muerte	◄	**Favorecen apoptosis**	►	Gen myc Fas FNT	Alta dosis de antígenos Citocinas Ciclo celular
bcl-2, Mcl-1, Bag-1, Boo/Diva bcl-XL, Bcl-w, A1, AKT	◄	**Inhiben apoptosis**	►	Superfamilia Bcl-2	

Figura 7-13. Factores que regulan la ruta de las células T activadas (Tact) en la respuesta inmunitaria secundaria. Los linfocitos T maduros pueden sufrir apoptosis. La sensibilidad para lograr la apoptosis es menor en linfocitos maduros y requiere activación previa. La ruta que siguen los linfocitos T al ser estimulados depende de una serie de elementos que determinan si la célula prolifera o si muere por apoptosis. CPA: célula presentadora de antígenos.

como la acción de tres enzimas: scramblasa, flipasa y flopasa, que median los movimientos de los fosfolípidos en una forma ATP y Ca^{++} dependiente.

1. La scramblasa se activa con un incremento del Ca^{++} intracelular y, de forma muy rápida, induce una aleatorización de la distribución de fosfolípidos.
2. La enzima flipasa transporta rápidamente los aminofosfolípidos (fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina) desde la cara externa de la membrana hacia la interna de una forma dependiente de ATP.
3. La flopasa, otra enzima dependiente de ATP, transporta lentamente y de forma no específica fosfolípidos de la cara interna a la externa.

Durante la apoptosis existe pérdida de la asimetría de la membrana y, por lo tanto, una externalización de fosfatidilserina como uno de los eventos más precoces. Existe muy poca información acerca del mecanismo de esta alteración, aunque podría suceder que, por una parte, el aumento intracelular de Ca^{++} y, por otra, las alteraciones en los niveles de PIP_2 y oxidación de LDL que se dan durante la apoptosis ocasionen un desacople de las enzimas encargadas de mantener la asimetría. Este evento es muy importante para el proceso general de la apoptosis, ya que marca a las células para su fagocitosis posterior (figura 7-14).

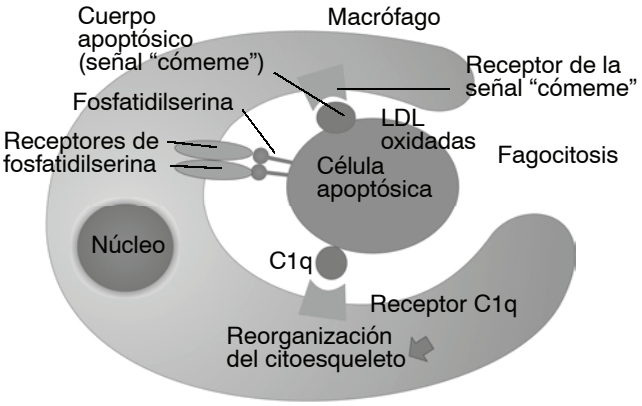


Figura 7-14. Esquema de la fagocitosis y la apoptosis. Los macrófagos reconocen la señal "cómeme" *(eat-me)* o cuerpos apoptósicos en la superficie celular. La exposición a fosfatidilserina en la superficie de la célula blanco se une a su receptor en el macrófago.

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

CAMBIOS NUCLEARES

Los cambios iniciales se acompañan de una reducción del núcleo. Esta alteración en la cromatina es fruto de la ruptura de la lámina nuclear, estructura que se encuentra bajo la membrana nuclear y que participa en su estabilidad. El aspecto del núcleo de una célula apoptósica se convierte en lo más característico de ésta. Aunque existen variaciones entre los distintos tipos celulares, en general se produce un aumento en la densidad de la cromatina, que comienza formando parches alrededor de la membrana nuclear y termina dando lugar a una o varias esferas densas en las últimas etapas.

Además de estos cambios morfológicos, en el núcleo celular se produce durante la apoptosis la fragmentación del DNA en una escalera de subunidades regulares que resultan del corte al azar entre los nucleosomas; llegan a sumarse hasta un millón de cortes, dando como consecuencia una situación en la que la transcripción se para, ya que no existe forma de ser reparada.

La ruptura del DNA es llevada a cabo por una endonucleasa que se activa vía caspasas. Esta endonucleasa fue primero descrita en ratones y se la denominó CAD *(caspase-activated desoxyribonuclease)*. Esta enzima se encuentra normalmente en el citoplasma de forma inactiva, por efecto del inhibidor ICAD que posee sitios de corte por caspasa 3. Durante el proceso de apoptosis, ICAD es degradado por la caspasa 3, y esto libera y permite la activación de la nucleasa CAD, que realiza su función sobre el núcleo de la célula. En seres humanos existe un sistema homólogo al descrito en ratones. Existe una proteína humana, DFF45 *(DNA fragmentation factor 45*), que tiene una secuencia significativamente similar a la de ICAD, y media también fragmentación del DNA en núcleos cuando se produce activación de la caspasa 3. De esta forma, se supone que DFF45 actúa en seres humanos sobre una nucleasa similar a CAD inhibiéndola igual que ocurre en el ratón. Aunque los efectos de la endonucleasa sobre el DNA celular sean tan drásticos, estudios realizados induciendo apoptosis en células con un inhibidor ICAD mutante resistente a caspasas demuestran que la célula muere por apoptosis en ausencia de fragmentación del DNA.

Esta muerte se traduce en ruptura de sustratos en el citoplasma, alteraciones típicas en la membrana plasmática, en la integridad de la mitocondria, etc. Todo esto conduce a la muerte de la célula que mantiene su DNA íntegro, aunque la cromatina sí presenta las alteraciones típicas de apoptosis, probablemente por la acción de caspasas sobre proteínas nucleares, como son poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP) (figura 7-15) o lámina nuclear.

Este hecho permite replantear la degradación del DNA en el proceso de apoptosis, no como medio de destrucción de la célula (que llega a morir igualmente en ausencia de fragmentación del DNA), sino como parte del proceso de limpieza de las células muertas, facilitando su fagocitosis o previniendo que el DNA íntegro pueda transformar a la célula fagocítica.

ELIMINACIÓN DE LA CÉLULA APOPTÓSICA

En el proceso de apoptosis, la muerte debe ser rápida, efectiva, controlada y sometida a buenos procesos de regulación, y una vez muerta, la célula debe ser retirada. De esta manera se evita su ruptura y el vertido de su contenido al medio, lo que daría lugar a una respuesta inflamatoria indeseable. Se han descrito tres estrategias para este proceso:

1. En ciertos tejidos con altas tasas de apoptosis existen fagocitos profesionales (macrófagos) que hacen esta función. Uno de los puntos más importantes en el estudio de este tema es la descripción de los mecanismos de reconocimiento de la célula apoptósica por parte de los macrófagos o las células vecinas encargadas de su eliminación.

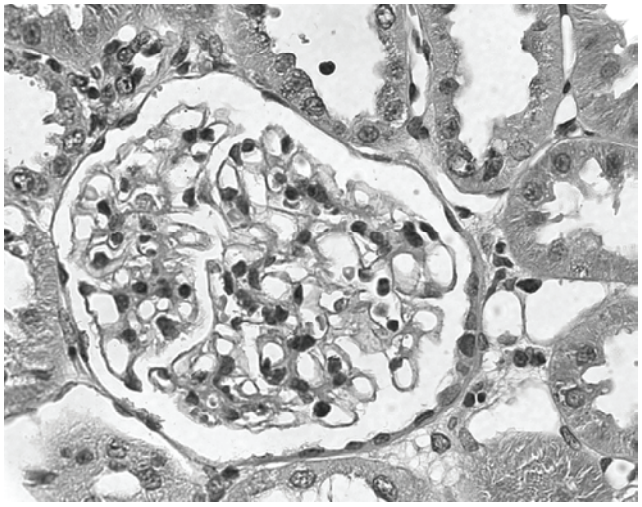


Figura 7-15. ADP-ribosa en un modelo de daño renal. La poli(ADP-ribosa)polimerasa (PARP) cataliza la transferencia de residuos de ADP-ribosa de nicotinamida adenina dinucleótido NAD a proteínas y modula la actividad de las enzimas topoisomerasas I y II. Inmunohistoquímica para PARP. 400 X.

www.elsolucionario.org

2. En tejidos con bajos índices de apoptosis, la fagocitosis es ejercida por células vecinas. Este mecanismo implica al sistema de interacción célula-célula de los carbohidratos de superficie, donde una célula se une a las lectinas de otra célula. Este sistema fue considerado a partir de la observación de que al añadir un azúcar, reconocida por determinadas lectinas de la superficie celular, como N-acetilglucosamina, se reduce en 50% la unión de macrófagos a timocitos apoptósicos, sin afectar su unión basal a timocitos no apoptósicos. La pérdida de residuos terminales de ácido siálico de las cadenas laterales de las glicoproteínas por parte de las células apoptósicas expone residuos normalmente enmascarados por ellas, que interaccionan con las lectinas de la superficie de macrófagos. Un receptor presente en los macrófagos, la integrina $\alpha 4\beta 3$, reconoce a la célula apoptósica por medio de una molécula puente, la trombospondina, que es secretada y sintetizada por macrófagos y sirve de puente al unirse al complejo formado por la integrina $\alpha 4\beta 3$ y CD36 en el macrófago y a la célula apoptósica.
3. El tercer mecanismo de reconocimiento es la pérdida de la simetría de fosfolípidos en la membrana plasmática de las células apoptósicas. Ésta provoca la exposición de la fosfatidilserina en la superficie de la célula apoptósica, la cual se une a un receptor en el macrófago.

Todos estos mecanismos intervienen en la eliminación de células apoptósicas. El funcionamiento de uno u otro depende de la especie y de la naturaleza, tanto de la célula apoptósica como del macrófago, los cuales requieren, además, de estímulos quimiotácticos para atraerlos hacia el sitio de apoptosis.

APOPTOSIS Y ENFERMEDAD

La apoptosis es una función biológica muy importante en la patogenia de varias enfermedades estudiadas hasta la fecha, como cáncer, miocardiopatías, trastornos del sistema inmunitario, malformaciones congénitas, trastornos metabólicos, neuropatías, etc. La alteración en el proceso de apoptosis puede ser de dos tipos:

1. Resistencia hacia la apoptosis, resultando en una muerte celular deficiente.
2. Incremento de la sensibilidad hacia la apoptosis, marcada por una muerte celular excesiva.

Las enfermedades caracterizadas por una deficiente o inadecuada apoptosis incluyen el cáncer, enfermedades autoinmunitarias (como el lupus eritematoso sistémico, la artritis reumatoide, etc.) e infecciones virales crónicas. Las enfermedades que presentan un incremento en la apoptosis incluyen trastornos neurodegenerativos como el Alzheimer, la enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), atrofia de la espina muscular, etc. También incluye enfermedades vasculares y el SIDA.

Se cree que las caspasas tienen una actividad importante en la patogénesis de estas enfermedades.

En algunas enfermedades asociadas con un exceso en la apoptosis, la activación de las procaspasas desempeña un papel fundamental. Por ejemplo, en la isquemia (insuficiencia vascular) se ha encontrado asociación entre la activación del mecanismo de apoptosis con la aparición de señales como el aumento de los radicales libres, el incremento en los niveles de Ca^{++} y la aparición de citocinas. Algunos indicios señalan que las caspasas son mediadores importantes de la apoptosis durante la isquemia:

1. La sobreexpresión del gen *crmA* protege a la célula de la muerte celular por hipoxia en los cultivos de tejido con modelo de isquemia.
2. La isquemia cerebral y sus consecuencias han sido asociadas con la rápida producción de IL-1β. Dado que la caspasa 1 es la única proteasa conocida que puede convertir pro-IL-1 β en su forma activa, esto sugiere que la caspasa 1 es activada durante la repercusión de la isquemia.
3. La caspasa 1 y otras caspasas son procesadas proteolíticamente durante la reperfusión de la isquemia cerebral.

Las enfermedades asociadas con una apoptosis deficiente presentan una inhibición o un decrecimiento en la actividad de la caspasa 10. La sobreexpresión del gen *bcl-2* ocasiona resistencia a la muerte celular por apoptosis. El gen *bcl-2* es un regulador negativo de las caspasas; la sobreexpresión del gen *bcl-2* en células tumorales las protege de la inducción de la apoptosis y previene la activación de la cascada proteolítica de las caspasas.

Apoptosis y neuropatías

En la neurogénesis, las neuronas se generan a partir de células precursoras que una vez diferenciadas no se dividen más y permanecer en estadio G_0.

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

Antes de emitir dendritas y axones, las neuronas inmaduras o las precursoras emigran desde el lugar de nacimiento en busca de la localización definitiva usando como camino moléculas de la matriz extracelular y el sistema glial. Esta migración, además, tiene como objetivo lograr las conexiones interneuronales correctas. Si esto no se efectúa correctamente, la neurona no recibe la acción de factores de crecimiento secretados por la célula receptora a que pertenece el axón conectado, y la célula que hizo la conexión equivocada muere por apoptosis. En la corteza cerebral, más de 90% de neuronas mueren por apoptosis durante la neurogénesis.

www.elsolucionario.org

Capítulo 8

Biología molecular del cáncer

Dolores Javier Sánchez González, Ismael Vásquez Moctezuma, Nayeli Isabel Trejo Bahena

INTRODUCCIÓN

El cáncer humano es una de las cinco primeras causas de muerte en los países desarrollados y en vías de desarrollo. Es interesante notar que las formas predominantes de cáncer varían de un país a otro, o bien siguen una tendencia diferente. Así, por ejemplo, en EUA los tipos más comunes de cáncer son los del pulmón, intestino grueso y mama, en tanto que en México predominan en los hombres los cánceres de próstata, pulmón y estómago, y en las mujeres el cáncer del cuello uterino y el de mama.

Desde el punto de vista de su origen (dependiendo del órgano, tejido o células del cual se originan) se han identificado más de 100 distintos tipos de cáncer. Los más frecuentes son los carcinomas, neoplasias que derivan de los epitelios. El cáncer generalmente se origina en individuos de edad avanzada y deriva de intestino, pulmón, cuello uterino y glándulas mamarias. En menores de edad y en jóvenes las neoplasias más frecuentes provienen de las células de la médula ósea dedicadas a la formación de las células sanguíneas y de los tejidos linfáticos. Se conocen otros tumores, como los sarcomas que se originan de los vasos sanguíneos y del tejido de soporte y fibroso.

La transformación de una célula normal a una cancerosa es un proceso complejo que sigue diversos pasos o etapas. En el cáncer de colon se ha podido establecer un modelo teórico del crecimiento y transformación de un enterocito normal hasta una célula de cáncer. El enterocito, después de adquirir diferentes alteraciones genéticas y cambios morfológicos, se transforma y maligniza en una célula de cáncer de colon. Los cambios van desde la proliferación (formación de poliposis) hasta la displasia, que termina en la malignidad con la invasión y la pérdida de la organización e interacciones con el tejido de origen. Por desgracia, no siempre se sigue un patrón de crecimiento predecible en las neoplasias; por lo general se saltan pasos y es casi imposible diseñar una evolución secuencial que explique el camino que lleva a una neoplasia y al desarrollo de metástasis.

ONCOGENES VIRALES Y ONCOGENES CELULARES

El cáncer es una enfermedad genética resultado de mutaciones que se acumulan en genes críticos para el crecimiento y desarrollo de las células somáticas. Sin embargo, el conocimiento inicial de los factores que intervienen en esta enfermedad se desarrollaron al estudiar neoplasias de animales de granja, encontrando que estas neoplasias se generan por la infección con virus oncogénicos. Estos virus son portadores de genes que codifican para proteínas con la capacidad de subyugar la actividad normal de las proteínas citoplasmáticas del huésped. Los puntos afectados son clave en el control del ciclo, crecimiento y diferenciación celulares, lo que lleva a una alteración grave en el crecimiento celular y al desarrollo del cáncer.

Cuando se buscaron estos mecanismos y virus tumorales en humanos se encontró que la mayoría de las veces el mecanismo que lleva al cáncer en humanos difería en el hecho de que para los humanos los virus sólo participan en algunos tipos de cáncer. Se encontró que las células eucariotas poseen genes (protooncogenes) que,

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

mutados o sobreexpresados, codifican para proteínas con capacidad oncogénica (oncogenes), genes que son muy parecidos a los oncogenes virales.

Por otra parte, al hacer experimentos de fusión celular entre células normales y células tumorales, se encontró que existen componentes citoplasmáticos capaces de revertir el fenotipo tumoral; a estos componentes, que en la actualidad se conoce que son proteínas que controlan el ciclo celular, la proliferación y la diferenciación, se les llamó genes supresores de tumores.

AGENTES MUTAGÉNICOS

Las alteraciones genéticas pueden generarse por agentes mutagénicos que existen en el ambiente en que vivimos y en buena medida provienen de la alimentación, sustancias químicas con las que interaccionamos todos los días. Los agentes mutagénicos también provienen de los intermediarios metabólicos generados en nuestras propias células, radiación de tipo ultravioleta, radiación ionizante del ambiente, etc.

El conocimiento de que factores ambientales y laborales participan de manera directa e indirecta en el cáncer se ha generado a partir de estudios médico-epidemiológicos que han encontrado asociaciones directas. Por ejemplo, Sir Percival Pott encontró la relación que existe entre el cáncer de escroto y la actividad de limpieza del hollín de chimeneas en las fábricas de Inglaterra. También se ha detectado la capacidad carcinogénica de algunas sustancias tóxicas que se encuentran en los alimentos; es el caso de las semillas almacenadas que por la humedad presentan el desarrollo de un hongo que posee una aflatoxina capaz de generar mutaciones al interaccionar con el DNA genómico.

Ya se ha caracterizado la relación que existe entre ciertos alimentos con la frecuencia en padecer diferentes tipos de cáncer; se sabe que una dieta rica en grasas puede condicionar el cáncer de mama. Los análisis epidemiológicos en México indican que los estados de la República localizados del centro hacia la frontera norte presentan más morbimortalidad por cáncer de seno que los que se localizan del centro a la frontera sur. Parece ser que los hábitos y costumbres en la alimentación modifican de manera importante el riesgo de padecer cáncer. Otro ejemplo lo constituye la relación entre un factor infeccioso que genera inflamación de la mucosa gástrica (*Helicobacter pylori*) con el riesgo de desarrollar cáncer de estómago o la asociación de la infección viral en el epitelio cervical por los virus del tipo asiático americano, que está relacionado de manera directa con el cáncer cervicouterino en mujeres mexicanas jóvenes.

EL CÁNCER Y LA HERENCIA

También se conoce que los individuos heredamos de nuestros ancestros la susceptibilidad (alelos de susceptibilidad) a padecer diferentes tipos de cáncer debido a que podemos ser portadores de mutaciones que pudieran condicionar al cáncer cuando se combinan con factores ambientales. El Dr. Knudson descubrió las diferencias epidemiológicas tan marcadas en un cáncer que se conoce como retinoblastoma, que se origina de las células retinianas; este tipo de neoplasia se presenta en niños y en adultos; en niños la presencia del retinoblastoma por lo general afecta ambos ojos (bilateral) a temprana edad y son más susceptibles de padecer otros tipos de cáncer. Sin embargo, en el caso del retinoblastoma del adulto, el tumor es unilateral. Knudson llegó a la conclusión de que para el caso del retinoblastoma infantil los individuos heredan de sus ancestros (línea germinal) o desarrollan desde periodos muy tempranos del desarrollo un alelo mutado y que durante los primeros años de vida sufrían la mutación del segundo alelo (hipótesis del segundo *hit*). Para el caso de la neoplasia en los adultos, los dos alelos se mutan durante la vida del individuo hasta que coinciden en una célula susceptible de desarrollar el cáncer.

El mecanismo para el desarrollo del cáncer basado en el segundo *hit* se repite en muchas neoplasias hereditarias; otro ejemplo: el desarrollo de cáncer de mama relacionado con la herencia de genes de susceptibilidad del tipo BRCA1 y BRCA. Para el caso de los tumores de piel destaca el melanoma, el cual también tiene un componente hereditario de apenas 10%.

ONCOGENES Y GENES SUPRESORES DE TUMORES

Para entender los mecanismos moleculares que llevan al cáncer es necesario caracterizar los diferentes genes relacionados y las mutaciones que los alteran. Con esta idea, los investigadores han estudiado más de 100 genes involucrados en el cáncer humano. Así se han caracterizado los genes críticos para el cáncer, que, como ya se

www.elsolucionario.org

indicó, se agrupan en dos clases: los genes cuya mutación genera una ganancia de función, llamados oncogenes, y los genes de segunda clase, que son los genes supresores de tumores que pueden inactivarse debido a diferentes mutaciones. Se sabe que existe un equilibrio entre la función de los protooncogenes y la función de los genes supresores de tumores; si el equilibrio se rompe puede aumentar la actividad de los protooncogenes, por alguna mutación o por la inactivación de los genes supresores de tumor. Lo anterior es el inicio de las alteraciones genéticas que, si se acumulan, dotan a la célula con capacidades malignas que desencadenan el cáncer.

ALTERACIONES EPIGENÉTICAS RELACIONADAS CON EL CÁNCER

Otro tipo de alteraciones que tiene relación con el cáncer es el de los cambios epigenéticos que pueden inactivar genes supresores de tumores por medio de la metilación de las citocinas en las secuencias CpG. También existe un mecanismo relacionado con la acetilación de histonas que se sabe puede reprimir o promover la expresión de genes. En general, los fenómenos de acetilación de histonas están relacionados con la expresión de genes y la deacetilación de histonas se relaciona con la inhibición de la expresión de genes. En el cáncer humano se ha observado un predominio de la actividad de la enzima deacetilasa de histonas, actividad que puede inhibir la expresión de genes supresores de tumores con el predominio de los oncogenes.

Puntos de control y el proceso de tumorigénesis

Los puntos de control del ciclo celular tienen una función importante en el mantenimiento de la fidelidad e integridad de la replicación y reparación del genoma. La dinámica del ciclo celular está regulada por estos puntos de control que actúan en la transcripción de los genes de CDC y de ciclinas, en las modificaciones postranscripcionales de estas proteínas o en la degradación de éstas. La replicación y la segregación del DNA, de los centriolos y de los polos ecuatoriales están finamente reguladas. Defectos en estos mecanismos resultarán en formas de inestabilidad genómica como deleciones, amplificaciones, translocaciones, no disyunción de los cromosomas y cambios en la polaridad del genoma. Estas aberraciones se presentan durante la evolución de las células normales hacia células con potencial tumorigénico. Los procesos de regulación por retroalimentación positiva y negativa también contribuyen a la progresión del ciclo celular. Los controles negativos en dicha progresión están presentes durante el desarrollo, diferenciación, senescencia y muerte celular, y pueden tener una función importante en la prevención de la tumorigénesis. Se conocen tres estadios donde operan los puntos de control en el ciclo celular: uno al final de la fase G_1 y la entrada a la fase S, otro en la transición de la fase G_2 a la fase M y el tercero en la fase U. De manera general, en la mayoría de los casos la interrupción de la proliferación celular ocurre cuando la integridad del genoma ha sido comprometida. Alteraciones en el proceso de interrupción del ciclo celular permiten que células con genomas inestables evolucionen a células cancerosas. Tales circunstancias podrían incluir la senescencia celular, en donde los telómeros (secuencias repetidas que están en los extremos de los cromosomas) se pierden o llegan a ser cortos y se forman los cromosomas dicéntricos inestables; la muerte celular por apoptosis, donde las nucleasas que degradan al DNA están alteradas, y la naturaleza de la respuesta inmunitaria del hospedero, donde se requiere el rearreglo de genes de inmunoglobulinas o del receptor de antígenos de linfocitos T, entre otros casos. No obstante, las células tienen la capacidad de detener la progresión del ciclo celular en una fase específica cuando el daño es inducido por agentes extrínsecos que inhiben la replicación del DNA.

Los genes que codifican para proteínas que participan en esta detención y que establecen la dependencia del ciclo celular son los que constituyen los puntos de control del ciclo, regulando los procesos de replicación, activación transcripcional, progresión del ciclo celular y apoptosis.

Durante el proceso de transformación de las células normales a células cancerosas ocurren varias alteraciones genéticas. En este proceso se presenta la pérdida del control de los mecanismos de replicación y reparación del DNA, así como de la segregación del material genético. Aunque las células normales tienen estrategias de defensa contra el desarrollo del cáncer, las células tumorales activan diferentes vías de escape que permiten la progresión de la neoplasia.

La fidelidad e integridad de la replicación del genoma son mantenidas por los puntos de control y los sistemas de reparación del DNA; el funcionamiento adecuado de estos procesos puede ser alterado por mutaciones genéticas.

Estos hallazgos sugieren que los mecanismos moleculares de regulación que participan en la transformación

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

celular pueden ser empleados como sistemas potenciales para instrumentar nuevas terapias contra el desarrollo del cáncer.

Las células cancerosas difieren de las células normales en muchas características, incluyendo la pérdida de la capacidad de diferenciación, el aumento de invasividad y la disminución de la sensibilidad a drogas citotóxicas. Estas características son resultado de la proliferación celular descontrolada y del proceso de evolución de la célula normal hacia una célula con potencial tumorigénico. La alta incidencia de cáncer, como una función de la longevidad celular, sugiere que se requieren múltiples alteraciones génicas para el proceso de tumorigénesis. Se ha sugerido que las células cancerosas presentan mutaciones que inducen inestabilidad genómica y, por lo tanto, aceleran la tasa de mutaciones del genoma. Algunas de estas mutaciones afectan a genes que codifican para componentes de los mecanismos de control del ciclo celular (puntos de control), los cuales determinan el orden de los eventos en dicho ciclo, así como la fidelidad e integridad de los sistemas de replicación y reparación del DNA. Además, aunque no está claro cuál es el origen génico de muchas enfermedades como la ataxia telangiectasia, anemia de Fanconi, etc., éstas se caracterizan por un aumento en la sensibilidad ante agentes que dañan al DNA, una alta frecuencia de rearreglos aberrantes en los genes y una alta predisposición al desarrollo de cáncer.

p53, el guardián del ciclo celular

El *p*53 es una proteína codificada por el gen supresor tumoral del mismo nombre y funciona bloqueando el ciclo celular si el DNA está dañado. Si el daño es severo, esta proteína puede provocar la apoptosis; por esta razón se conoce como el guardián del genoma o del ciclo celular. Es un regulador transcripcional con actividad supresora de tumores. La proteína presenta tres dominios: el N-terminal, que activa la transcripción; el central hidrofóbico, con regiones conservadas que al mutar alteran la capacidad de unión al DNA y su actividad como factor transcripcional, y el C-terminal, que participa en la oligomerización y unión específica al DNA. Entre las funciones más importantes de *p*53 se encuentra su capacidad para regular la transcripción de genes que participan en el control del ciclo celular. Su expresión induce un bloqueo en el crecimiento celular o la apoptosis, y su deleción o mutación conduce a una amplificación del DNA y, por lo tanto, a errores muy graves que dan lugar a cáncer. Una mutación de *p*53 ha sido detectada en 60% de los diferentes tipos de cáncer (figura 8-1).

El gen *p*53 es el gen más frecuentemente mutado en el cáncer humano, y su alteración (mutación o deleción) conduce a una supresión del punto de control situado en G_1-S. Los niveles de *p*53 están aumentados en células lesionadas, con lo que se aumenta el tiempo para reparar

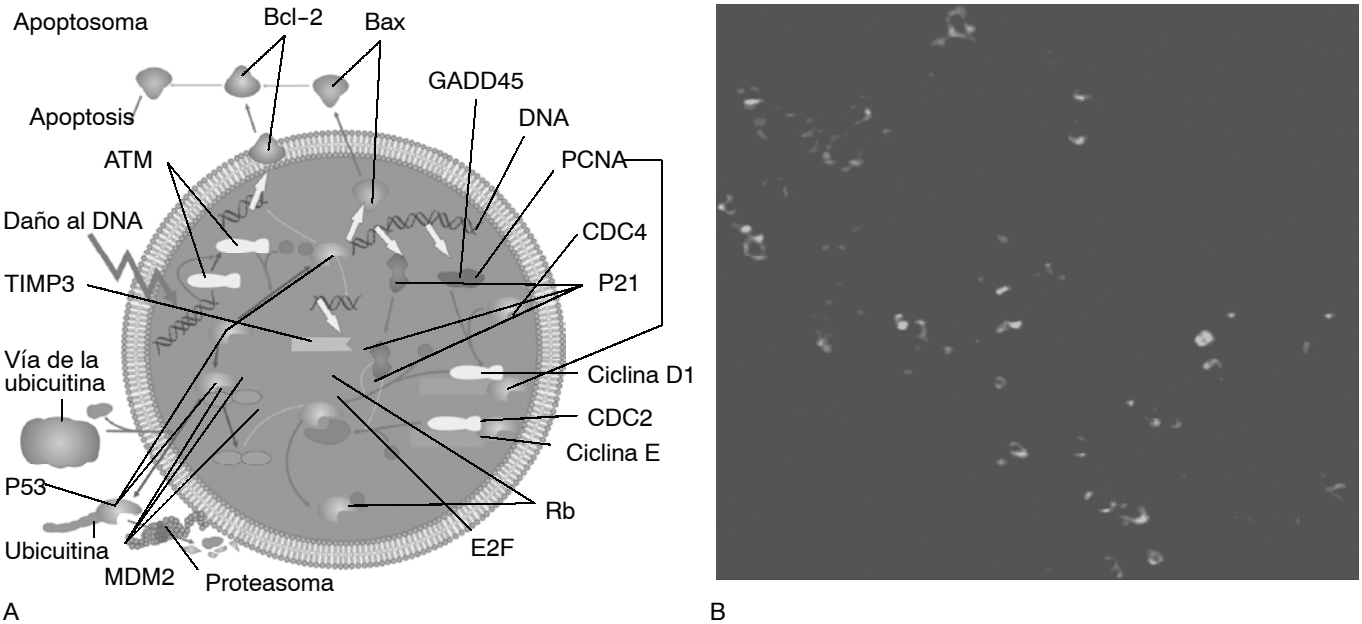


Figura 8-1. ***A.*** Vías de señalización de *p*53, PRb y apoptosis. *p*53 es un regulador transcripcional de genes que participan en el control del ciclo celular. Su expresión induce una detención en el crecimiento celular o la apoptosis, y su deleción o mutación conduce a una amplificación del DNA y, por lo tanto, a errores muy graves que originan cáncer. ***B.*** Epifluorescencia de núcleos positivos a *p*53 acoplado a rodamina en cáncer de próstata. Se observa la sombra negativa de los nucleolos. Inmunofluorescencia para *p*53 acoplado a rodamina. 100 X. TIMP3 = *tissue inhibitor of metalloproteinase 3*.

www.elsolucionario.org

el DNA por bloqueo del ciclo celular. La selección negativa en el tejido tímico ocurre por apoptosis, y las alteraciones en este mecanismo contribuyen al desarrollo de linfomas linfoblásticos. Por ejemplo, el oncogén Bcl-2, asociado a linfomas granulocíticos, bloquea la apoptosis mediada por *p*53 después de la irradiación de timocitos y otros tipos celulares.

En condiciones normales, *p*53 detecta el daño del DNA realizado por carcinógenos. En esta situación, las proteínas que *p*53 inhibe son TBP (*TATA box binding protein*) (lo que da lugar a la represión de muchos genes) y RPA (*replication protein A*) (dando lugar a la inhibición de una replicación del DNA alterado). *p*53 genera la transcripción de diversos genes que a través de sus productos proteicos regulan el ciclo celular y apoptosis. Estos genes son gadd45, Waf1/Cip1 (p21), MDM2 (*mouse double minute 2 homolog*) y BCL2/bax. Las mutaciones *p*53 heredadas producen el síndrome de Li Fraumeni, que conduce a una alta frecuencia de cáncer en los individuos portadores. La pérdida de la capacidad para que las células mueran por apoptosis puede contribuir a la inestabilidad genómica y tumorigénesis y, en consecuencia, a la pérdida del mecanismo de eliminación de células con daño génico. Esto ocurre tempranamente en la progresión del cáncer y permite la inestabilidad genómica con la supervivencia de células dañadas, o bien ocurre tardíamente en la tumorigénesis y contribuye a la supervivencia de las células en situaciones patológicas (figura 8-2).

Gadd45 (*growth arrest and DNA damage inducible gene*) puede suprimir la proliferación celular en asociación con otros genes Gadd y puede ser un efector de la detención en G_1. Waf1/Cip1 produce la proteína p21, que pertenece a la gran familia de los inhibidores de CDC. p21 inhibe además PCNA, pero fundamentalmente regula en particular el complejo ciclina E-CDC2, previniendo la hiperfosforilación de pRb. MDM2 es regulada por *p*53, pero a su vez MDM2 regula a *p*53, en un sistema de autorregulación. En el sistema BCL2/BAX, la proteína Bcl-2 promociona la supervivencia y Bax promociona la apoptosis, inhibiendo Bcl-2.

La proteína *p*53 también regula la producción de trombospondina-1, proteína que inhibe la angiogénesis, lo que implica que una *p*53 alterada genera un aumento de la angiogénesis tumoral. Además, a través de IGFB-P-3 (uno de los miembros de la familia factores de crecimiento de la insulina), *p*53 podría inactivar a un potente mitógeno del ciclo celular, como lo es IGF-1.

Efectos de pRb en el control del ciclo celular

Otro potente regulador transcripcional del ciclo celular es pRb, originalmente alterado en individuos con retinoblastoma. pRb es un gen supresor de tumores que inhibe la proliferación celular, esto se ha demostrado en células tumorales que carecen de este gen, y en el momento de transfectarlas con pRb se observa una supresión del potencial tumorigénico. Además, se ha observado que un exceso de pRb puede inhibir la proliferación celular aun en células normales. No se ha reportado que pRb tenga una regulación transcripcional, por lo que este gen se expresa constitutivamente en células en división o en esta-

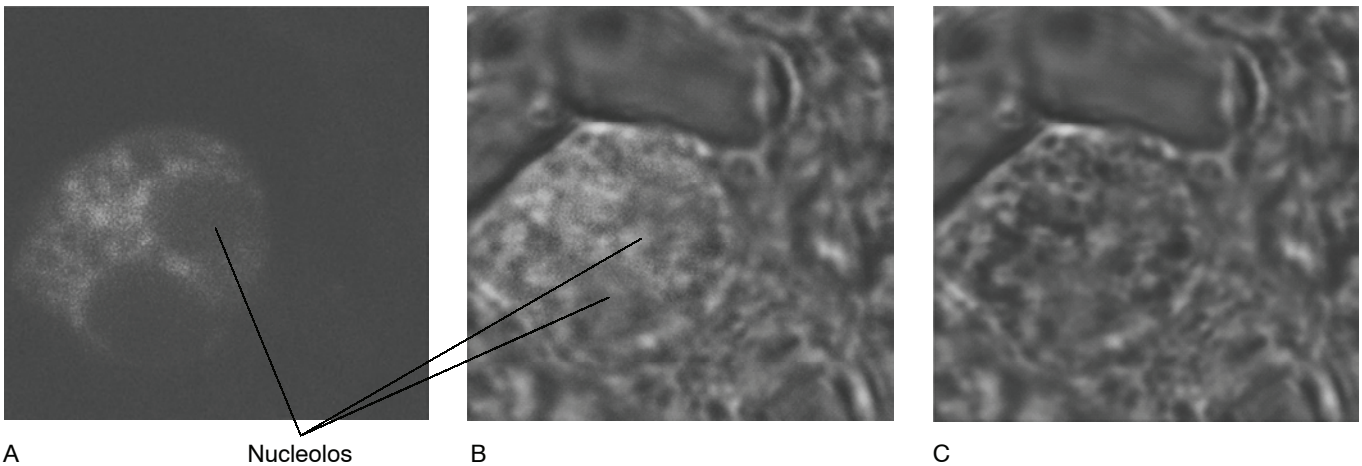


Figura 8-2. Fotografía confocal de *p*53. Es una proteína codificada por el gen supresor tumoral del mismo nombre y actúa bloqueando el ciclo celular si el DNA está dañado. Si el daño es severo, esta proteína puede inducir apoptosis; por esta razón se le conoce como el guardián del genoma o del ciclo celular. ***A.*** Se observa un núcleo repleto de *p*53 con dos nucleolos. ***B.*** *p*53 captado en dos canales: rodamina y contraste diferencial de interferencias tipo Varell. ***C.*** Núcleo celular captado por Varell. Inmunofluorescencia para *p*53. 4 000 X.

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

do de reposo. Por lo tanto, la regulación de pRb ocurre a nivel postranscripcional, por fosforilación de la proteína.

Para determinar la función de pRb se ha estudiado su estado de fosforilación durante el ciclo celular. En las fases G_0 y G_1 tempranas del ciclo, pRb se encuentra hipofosforilada (forma activa). La fosforilación de pRb ocurre entre las fases G_1 y S, y aumenta en las fases G_2 y M (forma inactiva) pero cuando la célula termina la mitosis, pRb se defosforila. La actividad de pRb está principalmente asociada a inhibición de la proliferación celular por contacto célula-célula, por falta de estímulos proliferativos o por la presencia de estímulos antiproliferativos, como TGF-β1 o TNF-β. En células normales en reposo, pRb se encuentra hipofosforilada y asociada al factor transcripcional E2F. Los diferentes estados de fosforilación de pRb durante el ciclo celular son provocados por los complejos CDC-ciclina. La expresión, fosforilación y formación de los complejos CDC-ciclina durante la fase G_1 tardía están asociados a la inactivación de pRb. Por ejemplo: CDC2 se une con pRb y la fosforila en residuos de serinas o treoninas *in vivo*. CDC4-D se une y fosforila pRb *in vitro*. Las ciclinas E y D se acumulan en la fase G_1 tardía, y su expresión corresponde al momento en el que ocurre la fosforilación de pRb, mientras que la expresión de la ciclina A ocurre en la fase S temprana y en la fase G_2, cuando pRb se encuentra hiperfosforilada. En general, las ciclinas D2 y D3 son más estables para formar complejos específicos con pRb que las ciclinas A y E. Además, en células con daño genético, la transfección con pRb induce interrupción de la proliferación celular en la fase G_1; sin embargo, al realizar cotransfecciones con las ciclinas A o E, se libera el paro celular inducido por pRb y se produce hiperfosforilación de esta misma. En tumores humanos donde pRb está mutada, ésta no se fosforila, y pierde la capacidad de suprimir la proliferación celular. Esta mutación impide la unión de pRb a factores de proliferación celular e incluso la unión con oncoproteínas virales, por lo que pRb puede actuar como un precursor de tumores al no inducir la interrupción del ciclo celular. No obstante, existen evidencias de la interrupción del ciclo celular por pRb al modular la actividad de varios factores de transcripción. Normalmente, el factor de elongación de la transcripción E2F forma un complejo con pRb no fosforilada e impide la transcripción de genes requeridos en la fase S. Estos complejos pRb-E2F pueden ser disociados por varias oncoproteínas virales como E1A del adenovirus y disocian los complejos de ciclina A, CDC2 y p107 unidos a pRb, que se forman durante la fase S. Por lo tanto, la formación de complejos entre pRb y E2F puede ser interferida por proteínas virales como E1A de adenovirus, E7 del virus del papiloma humano y antígeno T de SV40, que son capaces de unirse a pRb no fosforilada. El mecanismo de regulación por parte del complejo pRb-E2F ya ha sido bien caracterizado.

Finalmente, pRb no sólo actúa como gen supresor de tumores, sino también como activador de la transcripción de genes que suprimen la proliferación celular. Por ejemplo, la transfección con pRb activa la transcripción de los genes TGF-β1 y TGF-β2 en queratinocitos, factor que interrumpe la progresión del ciclo celular en la fase G_1. Además, se conoce que pRb puede participar en el proceso de apoptosis mediada por *p*53.

Telómeros y telomerasa

El envejecimiento de los organismos tiene efecto sobre las células que se dividen, ya que el número de veces que una célula se ha dividido influye directamente en la división celular. A este fenómeno se le conoce como envejecimiento celular. La restricción progresiva en el número de divisiones celulares se correlaciona directamente con el acortamiento progresivo de los extremos de los cromosomas o los telómeros en cada ciclo celular. Algunas estirpes celulares, como las células germinales, algunas células sanguíneas y células cancerosas, no presentan este fenómeno. Esto se debe a que estas células contienen una enzima activa del tipo ribonucleoproteína (contiene RNA y proteína) llamada telomerasa. Esta enzima agrega continuamente DNA a los extremos de los cromosomas o telómeros, evitando su acortamiento. En este caso, se considera que estas células son inmortales.

Antimitógenos extracelulares

El factor de crecimiento transformante beta TGF-β actúa como un antimitógeno extracelular, mientras que *p*53 es intracelular, donde actúa como proteína supresora de tumores. El TGF-β actúa sobre receptores específicos (TBR-I y II), generando una activación de p15 y p27. De esta manera, inhibe a los complejos ciclina D-CDC4 y ciclina E-CDC2, impidiendo la fosforilación de la proteína pRb y provocando la detención del ciclo celular.

GENES CLAVE EN LA GÉNESIS DEL CÁNCER (ONCOGENES)

En el hombre y en otros mamíferos se han identificado más de 40 genes cuya función está relacionada con la re-

www.elsolucionario.org

gulación del ciclo celular. Estos genes reciben el nombre de protooncogenes, porque en ciertas condiciones pueden actuar como oncogenes. Dirigen mecanismos que conducen al desarrollo de neoplasias. Los oncogenes pueden simultáneamente participar en la proliferación celular y la apoptosis.

De esta manera, el proceso de apoptosis puede estar regulado por genes que controlan la progresión del ciclo celular, lo que puede resultar en el aumento de la inestabilidad genómica y de la supervivencia de células transformadas.

El mecanismo mediante el cual se produce el descontrol de la multiplicación celular se explica mediante dos teorías principales: la teoría genética, que plantea que alteraciones adquiridas del genoma de las células somáticas dan origen al cáncer (mutación somática), y la teoría epigenética, que sugiere que una alteración metabólica induce la expresión de potencialidades neoplásicas, normalmente reprimidas en el genoma. Para convertirse en oncogenes, los protooncogenes son mutados por sustancias químicas, por radiación o por virus. Los mecanismos conocidos son:

Transducción

Un virus RNA secuestra a un protooncogén incorporado a su genoma. El provirus se inserta cerca del protooncogén; se produce la cotranscripción de la secuencia del protooncogén y de la secuencia viral. El protooncogén transducido se comporta anormalmente cuando es reintroducido en el genoma de otra célula y constituye un oncogén activado.

Mutagénesis insercional

La célula se infecta con un virus que tiene un gen promotor; este gen se inserta en la vecindad de un protooncogén, al que se desregula convirtiéndose en oncogén.

Redistribución cromosómica

Por ejemplo, translocaciones: en el linfoma de Burkitt, el gen *c-myc* del cromosoma 8 se inserta en el cromosoma 14, cerca del *locus* que codifica la cadena pesada de inmunoglobulina, con la consiguiente excesiva expresión del gen *c-myc*.

El cromosoma Filadelfia es el resultado de una translocación recíproca entre los cromosomas 9 y 22. El gen *abl* del cromosoma 9 se inserta en el gen *vcr* del cromosoma 22 (la porción desplazada del cromosoma 22 se encuentra en el cromosoma 9). Los genes *vcr* y *abl* se unen de tal forma que, cuando se expresan, se forma una proteína de fusión que consta de la cadena de aminoácidos de un extremo de *vcr* y la mayor parte o toda la proteína abl. Se piensa que esta proteína tiene un papel fundamental en la producción de la leucemia, pero aún no se sabe cómo actúa. El cromosoma Filadelfia, cuya identificación se utiliza con fines diagnósticos, corresponde a un cromosoma 22 pequeño.

Mutaciones puntuales

Son alteraciones moleculares generalmente con cambio de una o pocas bases del protooncogén.

Amplificación

Es la formación de muchas copias de un protooncogén. Se ha demostrado que la formación de múltiples copias de un oncogén (de la familia *erb*) está relacionada con el grado de agresividad del cáncer de mama.

Los oncogenes codifican la síntesis de moléculas que participan en proteínas a las cuales se unen los factores de crecimiento, génesis del RNA mensajero y replicación del DNA. Estos mecanismos están relacionados con la función de los factores de crecimiento. Se cree que los oncogenes pueden aumentar la producción de factores de crecimiento de la misma célula, el número de receptores de factores de crecimiento, la afinidad de los receptores y la sensibilidad de la célula a la señal de proliferación emitida por la unión del factor de crecimiento con su receptor (cuadro 8-1).

Cuadro 8-1. Algunos oncogenes conocidos y neoplasias asociadas

Oncogén	Neoplasia
EGFR	Carcinoma basocelular de la piel
SRC	Cáncer de colon
v-fos	Osteosarcoma
v-jun	Sarcoma
NEU	Neuroblastoma, cáncer de mama
RET	Cáncer de tiroides
K-RAS	Leucemia mieloide aguda, cáncer de tiroides, melanoma
H-RAS	Cáncer de colon, pulmón y páncreas
N-MYC	Neuroblastoma
L-MYC	Cáncer de pulmón

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

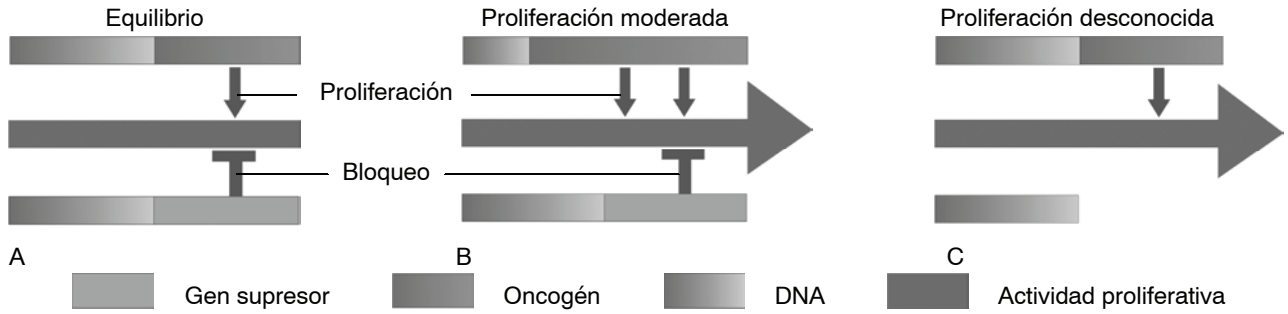


Figura 8-3. Esquema de la regulación de la actividad proliferativa. ***A.*** Se muestra el equilibrio de la proliferación. ***B.*** El efecto de los oncogenes predomina y existe proliferación celular. ***C.*** No existe la actividad supresora que contrarreste al oncogén, y las células proliferan descontroladamente.

GENES SUPRESORES (ANTIONCOGENES)

La existencia de genes supresores (llamados en algún tiempo antioncogenes) se sospechó a partir de la supresión del fenotipo canceroso en los experimentos con fusión de células tumorales y normales denominados hibridomas. Los estudios epidemiológicos sobre tumores familiares fueron un apoyo decisivo. En este sentido, fue de gran interés la observación de pérdida de material genético en el cromosoma 13 en los casos de retinoblastoma. Al principio se creía que en el material perdido debía alojarse un antioncogén; su falta "dejaría en libertad" al gen para desarrollar la neoplasia. Pero hoy se sabe que los oncogenes y genes supresores actúan de manera diferente (figura 8-3).

Un rasgo común a todos los genes supresores es que su potencial oncogénico se manifiesta sólo cuando no se expresan. Es decir: cuando la proteína no se sintetiza o es hipofuncional. Para que esto ocurra no basta con una sola mutación; es necesario un segundo cambio génico que afecte al alelo normal (pérdida de heterozigotia). Muchas células neoplásicas tienen numerosas zonas con pérdida de heterozigotia, lo cual sugiere que existen antioncogenes todavía no identificados.

Los primeros genes supresores descubiertos fueron *RB1* y *TP53*, que controlan, junto con otros genes, la puerta situada en G_1–S. *p*53 sólo interviene en el control del ciclo celular si se detectan alteraciones no reparadas en la molécula de DNA; detiene el paso G_1–S hasta que la lesión se repara. Si la lesión es irreparable, entonces activa el proceso de apoptosis para eliminar la célula lesionada. Interviene también en la transición G_2–M como respuesta a cambios en el DNA. Otro gen supresor que interviene en el control de la proliferación celular es *CDCN2*/*INK4*, el cual codifica para p16. Se encuentra inactivo en un número muy importante de neoplasias, bien porque haya experimentado una mutación o porque no se transcribe. Hay, además, cerca de 30 genes supresores relacionados con síndromes hereditarios en los que existe un riesgo de cáncer mayor que en la población general.

Genes supresores de metástasis

La metástasis es el atributo más letal del cáncer, pero la habilidad de los médicos para detectarla e intentar localizar con éxito el cáncer ha mejorado en años recientes. Sin embargo, la enfermedad metastásica sigue siendo la causa más común de muerte relacionada con cáncer.

Existe una necesidad crítica de identificar los marcadores que distingan exactamente los cambios histológicos y las células diseminadas que tengan alta probabilidad de causar enfermedad clínica metastásica importante. Se ha incrementado la preocupación de que la "metástasis" ocurra en el momento del diagnóstico del tumor primario, lo cual es demasiado tarde para utilizar la terapia antimetastásica. Sin embargo, la extensión de las células del cáncer dentro de la vasculatura o del sitio secundario no constituye metástasis. El desarrollo de metástasis clínicamente significativa requiere que las células de cáncer completen una serie de pasos bien definidos, generalmente referidos como cascada metastásica. Si las células fallan en completar uno de esos pasos, la metástasis no se desarrollará.

La importancia clínica de la diseminación de células de cáncer (detectadas por métodos sensibles como una reacción de cadena polimerasa reversa RT-PCR) se ha convertido en una herramienta de considerable interés. El primer paso para desarrollar terapias efectivas para inhibir el crecimiento es identificar los genes/proteínas que regulan la colonización. Para este fin se están realizando numerosas investigaciones que centran su aten-

www.elsolucionario.org

ción en el descubrimiento de los genes que regulan de manera específica la habilidad de desarrollar metástasis de las células cancerosas. Por ejemplo, varios genes promotores de metástasis, incluyendo *WDNM-1*, *WDNM-2*, *MMP11* (stromelisina-3), *MTA1* y *ERBB2*, se han identificado con asociación del desarrollo de metástasis de cáncer de mama.

Los genes supresores de metástasis suprimen la formación de metástasis macroscópicas espontáneas sin afectar la velocidad de crecimiento del tumor primario. Hace más de 10 años que se descubrió el primer gen supresor de metástasis *nm23 H-1 (NME1)*.

La metástasis se define como la formación de crecimiento progresivo en un foco secundario de un sitio discontinuo de la lesión primaria. La formación del tumor primario requiere un cuadro molecular y alteraciones celulares que permitan a las células evitar los mecanismos de control de crecimiento, así como manipularlos en su medio ambiente local. Estos cambios incluyen el desarrollo de una fuente sanguínea cada vez que el foco de crecimiento de células transformadas deje un tamaño que pueda ser alimentado por nutrientes o difusión de metabolitos. La progresión del tumor y la adquisición de competencia metastásica requiere cambios adicionales en la expresión de los genes (por ejemplo, degradación proteínica de enzimas y moléculas de adhesión) que culminen en un fenotipo maligno. Después de la invasión a tejidos adyacentes, las células tumorales se diseminan a través de los vasos sanguíneos o linfáticos, y viajan individualmente o como un émbolo hecho de células tumorales y células huésped. En el sitio secundario, las células o émbolos se detienen por su tamaño físico o por uniones a moléculas específicas en órganos particulares o tejidos. Varios factores contribuyen para observar la ineficiencia de formación de metástasis, como la baja tasa de supervivencia de las células en la circulación y el bajo porcentaje de células que escapan sorprendentemente hacia los tejidos circundantes.

Los grupos de células proliferantes crecen dentro de las lesiones y consisten en unos cientos de células que pueden ser detectadas mediante métodos histológicos. Las células que están dentro de lesiones microscópicas pueden recibir oxígeno y nutrientes mediante difusión. El crecimiento progresivo de lesiones microscópicas dentro de la metástasis evidente macroscópica (> 1 mm) requiere que la fracción de proliferación celular exceda la fracción que requieren cuando son quiescentes o apoptósicas.

Los genes supresores de metástasis suprimen la formación espontánea de metástasis macroscópica. Como implica su nombre, estos genes son distintos de los oncogenes, que promueven la transformación celular, y de los genes supresores del tumor, los cuales suprimen el crecimiento del tumor. Mientras que el primer gen supresor de metástasis *nm23 H-1* fue identificado por sustracción cuidadosa de DNA complementario (cDNA), la mayoría de las actividades supresoras de metástasis han sido descubiertas utilizando la técnica de *microcell-mediated chromosomal transfer* o MMCT. Los estudios que utilizan células de cáncer de próstata muy metastásica como receptores de transferencia cromosomal muestran que los cromosomas específicos 12 y 17 suprimen la habilidad metastásica de esas células; la supresión de metástasis observada no afecta la velocidad de crecimiento del tumor. Los estudios análogos de líneas celulares de cáncer de próstata transfieren cromosomas supresores a las células. Estos hallazgos pueden ser resultado de tres mecanismos alternativos:

1. El gen de la misma región del cromosoma puede tener diferentes funciones dependiendo del tipo celular en que se exprese.
2. Una región cromosomal puede codificar un número de genes diferentes, uno de los cuales puede no ser activo como un gen supresor de metástasis en células de cáncer de próstata, puede ser inactivado o no se expresa en las células de este cáncer.
3. Los genes pueden funcionar como genes supresores de metástasis cuando se expresan en células de cáncer de próstata, pero pueden ser inactivados o no se expresan en líneas celulares de este cáncer.

La naturaleza de las interacciones celulares con la matriz extracelular puede regular la expresión genética en tejidos específicos; las células forman una cadena tridimensional compuesta por el núcleo, citoesqueleto y matrices extracelulares. Asimismo, los efectos diferenciales quedan como la transferencia de un cromosoma hacia los diferentes tipos de células, y pueden dar como resultado una expresión diferencial de los genes sobre el cromosoma; en esta vía, una célula responde a su medio ambiente. Durante la década pasada, varios cromosomas humanos fueron probados funcionalmente a través del uso de MMCT, y las actividades supresoras de metástasis se reportaron sobre los cromosomas 1, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 16 y 17. A la fecha, cinco genes: *nm23 (NM1)*, *KAI1*, *KISS1*, *BRMS1* y *MKK4 (MAP2K4)* han servido como muestra para encontrar el criterio de genes supresores de metástasis. El papel de otros genes, como *CD44 maspina*/*PI5*, en la supresión de metástasis es menos definido. La disminución en la expresión de un gen supresor es el parámetro que determina su potencial metastásico y puede ocurrir por una variedad de

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

mecanismos. A la fecha, *nm23 (NME1)* y *KAI1* son los genes supresores mejor caracterizados.

Nm23 H-1 (NME1)

La familia de los genes *nm23* ha sido caracterizada sobre la base de su expresión reducida en líneas de células muy metastásicas y tumores. En tejidos humanos se han identificado tres miembros: *nm23-H1*, *nm23-H2* y *nm23-DR*. La transfección de nm23 cDNA dentro de la línea celular murina K-1735 TK, B6F10 o B16FE7; en células de melanoma; en células de adenocarcinoma mamario en rata MTLn3 o células humanas de carcinoma de mama MDA-MB-435, resulta en una reducción significativa del potencial de metástasis del tumor *in vivo*, esto provee evidencia de que *nm23* puede tener una función de supresión de metástasis.

El prototipo de gen supresor de metástasis *nm23 H-1* fue identificado en el melanoma murino K1735 mediante el uso de hibridación sustractiva (un método para identificar genes expresados diferencialmente entre dos líneas celulares); se han identificado en seres humanos seis homólogos. El gen *nm23 H-1* se encuentra en la región 17q21.3

La pérdida de la expresión de *nm23 H-1* se ha asociado con un potencial metastásico en la mayoría de los estadios tardíos del tumor. En cáncer de pulmón, colon, próstata, etc., no hay alteraciones en la expresión de *nm23 H-1*; es posible que la función biológica de *nm23 H-1* no influya en la progresión de malignidad en ese tipo de células.

El mecanismo de acción para la supresión de metástasis de *nm23 H-1* es desconocido; sin embargo, la evidencia sugiere que es una fosforilación, y puede estar involucrado en un proceso novedoso que, en teoría, controla la motilidad celular (figuras 8-4 y 8-5).

MARCADORES TUMORALES

Los marcadores tumorales son genes, RNA mensajeros y proteínas asociados con enfermedades malignas. Pueden ser detectados en tumores sólidos, en células tumorales circulantes en sangre periférica, nódulos linfáticos, médula ósea y otros fluidos corporales, como materia fecal, líquido ascítico y orina. También pueden utilizarse para definir una entidad patológica particular, para su diagnóstico, estadificación, pronóstico, y en algunos casos son utilizados como estudio de escrutinio *(screening)* en la población. Los marcadores tumorales pueden ser:

1. **Proteínas celulares específicas sobreexpresadas en células malignas.** Algunas proteínas se expresan normalmente en células diferenciadas; sin embargo, su expresión se eleva demasiado en células tumorales, por lo cual el aumento de su concentración puede utilizarse como marcador tumoral.
2. **Proteínas tumorales específicas.** Son marcadores tumorales expresados solamente en células tumorales. Estos marcadores se forman cuando un oncogén es translocado y fusionado a un promotor activo de otro gen; el resultado es una producción activa y constante de proteínas de fusión, lo que induce al desarrollo de una neoplasia. Por ejemplo, el cromosoma Filadelfia es un marcador tumoral de leucemia mieloide crónica (LMC).
3. **Proteínas no específicas o marcadores relacionados con células malignas.** Son antígenos oncofetales que se expresan normalmente en células durante el periodo embrionario; sin embargo, al igual que los marcadores del grupo 1, su expresión se eleva demasiado en células tumorales,

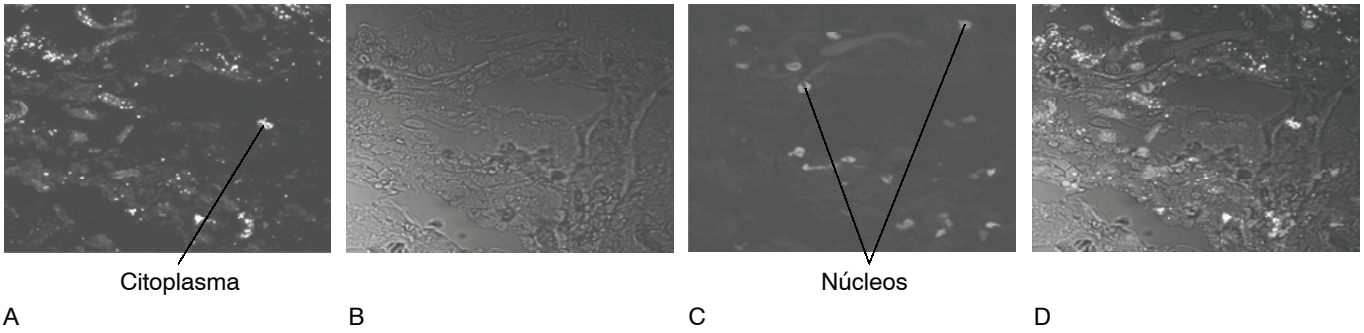


Figura 8-4. Microscopia confocal realizada en cáncer de próstata. ***A.*** La fluorescencia verde corresponde a la proteína inhibidora de metástasis nm-23-H1. ***B.*** Contraste diferencial de interferencia tipo Varell. ***C.*** La fluorescencia roja corresponde a núcleos celulares positivos a *p*53. ***D.*** Colocalización de *p*53, nm 23 H1 y Varell. Doble inmunofluorescencia *p*53-rodamina y nm23 H1-fluoresceína. 1 000 X.

www.elsolucionario.org

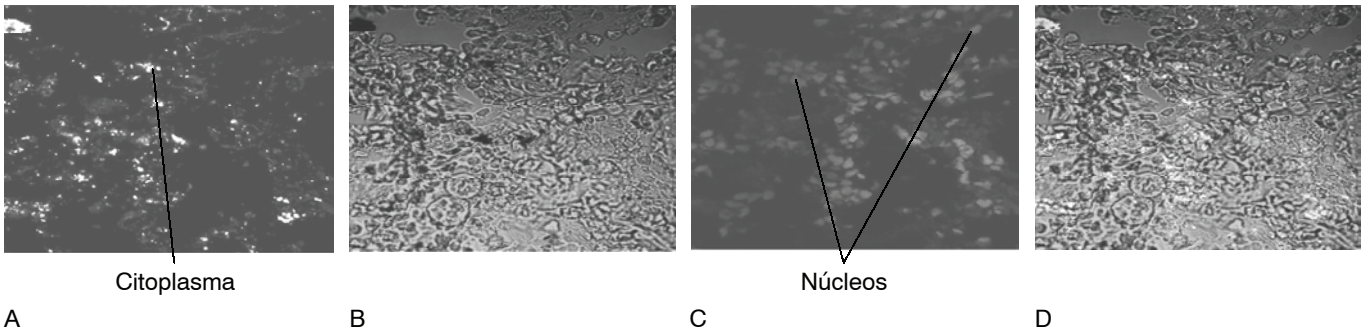


Figura 8-5. Microscopia confocal realizada en melanoma. ***A.*** La fluorescencia verde corresponde a la proteína inhibidora de metástasis nm-23-H1. ***B.*** Contraste diferencial de interferencia tipo Varell. ***C.*** La fluorescencia roja corresponde a núcleos celulares positivos a *p*53. ***D.*** Colocalización de *p*53, nm 23 H1 y Varell. Doble inmunofluorescencia *p*53-rodamina y nm23 H1-fluoresceína. 1 000 X.

por lo cual el aumento de su concentración puede también utilizarse como marcador tumoral. Dos ejemplos clásicos de estos marcadores son el antígeno carcinoembrionario (ACE) y la alfafetoproteína (AFP).

CONTROL DEL CICLO CELULAR Y TERAPIA CONTRA EL CÁNCER

En términos generales, en las estrategias instrumentadas contra el desarrollo del cáncer, el efecto que produce la mayoría de los agentes antineoplásicos es: daño al DNA, al aparato mitósico, a las topoisomerasas, o inhibición de la síntesis o incorporación de precursores del DNA. El éxito de estos agentes en la muerte selectiva de las células cancerosas varía principalmente en función del tipo de cáncer.

Algunos tipos de cáncer son sensibles a estos agentes y son curables (leucemia linfoblástica aguda y cánceres de células germinales), mientras que otros son relativamente resistentes y no son curables (carcinoma de colon).

Esta variabilidad de respuestas refleja la especificidad celular ante los agentes anticancerígenos. En consecuencia, los puntos de control del ciclo celular representan una buena opción para la aplicación de los agentes quimioterapéuticos.

Estos puntos tienen las siguientes características:

1. Se localizan en todas las células. La mayoría de los genes de los puntos de control son esenciales en células normales, ya que ellos codifican para componentes de la maquinaria del ciclo celular que emiten o suprimen señales, o porque participan en más de una función celular. Para las vías no esenciales, los agentes terapéuticos que están dirigidos hacia los puntos de control sólo serán detectados por su sinergismo con otros agentes que dañen a la célula.
2. Los puntos de control son sistemas de transducción de señales. La existencia de varios componentes para cada uno de los puntos de control sugiere la presencia de cascadas de transducción de señales, y cada una de éstas representa múltiples blancos para la intervención terapéutica.
3. Los puntos de control aseguran la fidelidad e integridad de la replicación y segregación genómica. La reparación del daño espontáneo del DNA requiere el correcto funcionamiento de los puntos de control para que las células mantengan esta fidelidad e integridad en la replicación del genoma. Por lo tanto, la restauración de los puntos de control que están alterados podría retardar la evolución de la célula normal a célula cancerosa, de igual manera que en ausencia de fuentes exógenas que dañan al DNA.
4. Los sistemas de transducción de señales exhiben adaptación. Si los puntos de control están dañados, las células prosiguen el ciclo celular aun cuando la alteración no haya sido reparada. Las alteraciones génicas que aumentan la habilidad de las células para adaptarse podrían acelerar la evolución del proceso neoplásico. Además, la inhibición de los componentes involucrados en la adaptación sugiere blancos terapéuticos para reparar los puntos de control alterados, como un mecanismo que retardaría la evolución de las células normales a células precancerosas.
5. La activación de los puntos de control induce una variedad de respuestas celulares. Por ejemplo, la

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

expresión anormal de *p*53 en células que entran a la fase S con el DNA dañado es más nociva, por el hecho de que estas células no sufren muerte por apoptosis. La función de los puntos de control en la apoptosis está influida por el tipo celular y por la naturaleza de las señales de proliferación, o bien por el daño al cual las células responden. La restauración de los puntos de control podría inducir la respuesta de muerte celular por apoptosis de las células cancerosas y aumentar la sensibilidad a los agentes que dañan el DNA. De hecho, al aplicar terapia génica con *p*53 normal a células de cáncer cervicouterino, se induce el proceso de apoptosis. Por lo tanto, los componentes de la respuesta apoptósica podrían ser usados como blancos terapéuticos si la apoptosis pudiera ser activada en ausencia de daño al DNA. Esto podría ser posible para probar la especificidad de cierto tipo de células cancerosas, ya que no todas las células responden a las mismas señales apoptósicas.

El conocimiento de nuevas drogas que inhiben o activan puntos de control permite el desarrollo de estrategias terapéuticas eficientes.

Para los cánceres localizados, la inhibición de un punto de control no tiene efecto en las células que simultáneamente no se expusieron a agentes que dañan el DNA, por lo que la radiación local de los cánceres o la acción de agentes citotóxicos facilitará el uso de tales compuestos.

Las células de individuos con ataxia telangiectasia tienen alteraciones en los puntos de control que regulan el ciclo celular en la transición de la fase G_1 a la fase S, y de la fase G_2 a la fase M después de la radiación local, y son sensibles a efectos citotóxicos de radiación. Por lo menos uno de los genes responsables de ataxia telangiectasia ha sido localizado en el cromosoma 11q23, y éste podría ser un blanco terapéutico idóneo.

Una característica que puede distinguir a los cánceres que son curados con quimioterapia es la capacidad de sanar por un rápido proceso de apoptosis en respuesta a agentes citotóxicos. Algunos de los genes que regulan la progresión del ciclo celular de la fase G_1 a la fase S están involucrados en el control de la apoptosis. Además, la muerte celular por apoptosis ocurre como un balance del control positivo y negativo de las señales de proliferación, lo cual sugiere asociaciones entre genes que controlan el proceso de apoptosis y el ciclo celular. Estos genes son posibles blancos para la manipulación de la supervivencia celular después de la exposición a agentes citotóxicos.

El producto del gen *Bcl-2* protege a las células de la muerte por apoptosis mediada por Bax. La caracterización de otras moléculas similares a Bcl-2 o que interactúan con Bcl-2, como Bcl-X y Mcl-1, sugieren blancos atractivos para el implemento de terapias anticancerígenas. Por otra parte, mientras que los fibroblastos usan a *p*53 para interrumpir el ciclo celular después del daño al DNA, los timocitos mueren por apoptosis mediada por *p*53. La pérdida de la función de *p*53 en las células que inician el proceso de apoptosis produce resistencia al tratamiento citotóxico. Así, una terapéutica global sería inducir el proceso de apoptosis, en lugar de interrumpir el ciclo celular en las células cancerosas que tienen *p*53 mutado.

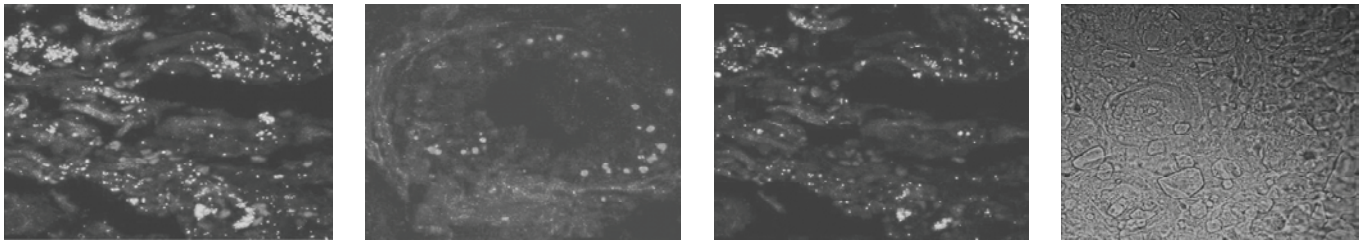
Los controles moleculares de la progresión del ciclo celular pueden proveer nuevos blancos para agentes citotóxicos. Por ejemplo, las células cancerosas mutadas en pRb tienen un aumento en los niveles de E2F-1, lo cual teóricamente resultaría en el aumento de la transcripción de ciertos genes, como dihidrofolato reductasa *(DHFR)*, timidilato sintetasa *(TS)*, ribonucleótido reductasa *(RR)* y timidina cinasa *(TK)*. El aumento de la expresión de DHFR induce resistencia a metotrexate, una droga antineoplásica. De manera similar, el 5-fluorouracilo u otros inhibidores de TS pueden ser efectivos, no sólo porque funcionan regulando negativamente a DHFR, sino porque actúan uniéndose a TS e inhiben su actividad. Tal efecto podría ser usado en el osteosarcoma, en el cual pRb está mutado, y el metotrexate es un agente antineoplásico comúnmente usado. Además, el metabolismo de purinas se ha estudiado ampliamente y representa otra alternativa para el desarrollo de agentes antineoplásicos.

Nuevos productos de genes sobreexpresados en cánceres específicos proveen otros blancos potenciales para la terapia contra el cáncer. Por ejemplo, la proteína quimérica timidina cinasa, bcr-abl y el factor transcripcional AML-1 no están presentes en los tejidos normales, pero se generan de translocaciones cromosomales en la leucemia mieloide crónica y en la leucemia mieloide aguda, respectivamente. Estas proteínas contribuyen a la alteración del ciclo celular y el proceso de apoptosis en las células malignas; por lo tanto, disparan la expresión de genes específicos, afectando la mayoría de los puntos de control.

La reciente demostración de la expresión de telomerasa en células cancerosas pero no en células normales, así como la potencial dependencia de las células cancerosas de la actividad de la telomerasa para la viabilidad, supone a la telomerasa como otro blanco atractivo para la terapia específica anticancerígena.

La pérdida de telomerasa probablemente activa los puntos de control en la transición de la fase G_2 a la fase

www.elsolucionario.org



A B C D

Figura 8-6. Microscopia confocal realizada en: ***A*** y ***B.*** Cáncer de próstata. ***C.*** Hiperplasia prostática benigna. ***D.*** Control negativo de inmunofluorescencia; la estructura que se observa corresponde a cáncer de próstata y es captada sólo con contraste diferencial de interferencia tipo Varell. La marca en rojo corresponde a núcleos celulares positivos a *p*53 y la fluorescencia verde corresponde a la proteína inhibidora de metástasis nm-23-H1. Doble inmunofluorescencia *p*53-rodamina y nm23 H1-fluoresceína. 1 000 X.

M, induce la interrupción del ciclo celular y probablemente el proceso de apoptosis.

Apoptosis y cáncer

Respecto del cáncer, el factor biológico más importante antineoplásico parece ser la proteína *p*53 sintetizada por el gen humano *p*53. Es una fosfoproteína proapoptósica que se activa ante la presencia de mutaciones del DNA, actuando en las fases G_1 y G_2 del ciclo celular. Controla la reparación de lesiones del DNA efectuada por DNA polimerasas específicas y frena el ciclo celular. También detecta células neoplásicas agresivas frenando su capacidad de producir angiogénesis para facilitar las metástasis. La proteína *p*53 se agota rápidamente, por lo que debe ser sintetizada en forma constante. Su función es frenar el ciclo destruyendo células mediante la apoptosis antes de llegar a la etapa de citocinesis, a fin de impedir que se repliquen mutaciones carcinogenéticas, que producirían nuevas células tumorales cada vez más agresivas. Además, se ha encontrado que el aumento de concentración de la proteína *p*53 lleva a la apoptosis celular. El objetivo es controlar la existencia de daños en el DNA. Se sabe que algunas células de la piel, cuando se exponen al sol, experimentan apoptosis debido al daño producido por radiación o exposición solar reiterada con altas dosis de radiación UVB. Las células que sufren cambios fatales (mutaciones) pierden el control del ciclo celular y continúan multiplicándose, acumulando daños en su DNA y transmitiéndolo generación tras generación. De esta manera, se genera así una estirpe celular que va acumulando mutaciones en su genoma, y si éstas afectan los genes que controlan la multiplicación celular, entonces se pueden transformar en cáncer (figura 8-6).

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

www.elsolucionario.org

Capítulo 9

Microscopia

Dolores Javier Sánchez González, Luis Humberto Pérez Astudillo

INTRODUCCIÓN

El microscopio es el instrumento más importante en la histología debido al pequeño tamaño de las estructuras analizadas. El poder de resolución se define como la capacidad de distinguir como imágenes separadas dos puntos cercanos, y se mide utilizando como unidad la inversa del límite de resolución (poder de resolución = 1/límite de resolución). El límite de resolución es la distancia mínima entre dos puntos para que puedan distinguirse como tales (límite de resolución = 0.61 x longitud de onda/apertura numérica). La longitud de onda dependerá de la luz empleada. La apertura numérica (AN) es igual a *n* x seno *u*, donde *n* es el índice de refracción del medio que separa el cubreobjeto de la lente frontal del objetivo, y *u* es la mitad del ángulo superior del haz de luz. El límite de resolución del ojo humano sin ayuda de lentes es de 0.25 mm = 250 000 nm. El aumento útil del microscopio se define como el aumento visual del microscopio que puede ser utilizado totalmente por el ojo del observador.

HISTORIA DE LA HISTOLOGÍA Y DEL MICROSCOPIO

Aristóteles (384-322 a. C.) clasificó 540 especies de animales según su forma y aspecto exteriores; por esta razón se le considera el padre de la biología. La biología es la ciencia que estudia a los seres vivos; este concepto fue creado a principios del siglo XIX por Jean-Baptiste Lamarck (1744-1829), en Francia, y Gottfried R. Treviranus, en Alemania. En 1543, el anatomista belga Andreas Vesalius publicó su gran tratado en anatomía *De humani corporis fabrica* (*En la estructura del cuerpo humano*), que causó toda una revolución en el estudio del cuerpo humano y de la medicina. Gabriel Fallopius descubrió las trompas uterinas y el tímpano. El médico inglés y anatomista William Harvey realizó estudios sobre el movimiento del corazón y sobre la sangre en 1628. Marcello Malpighi (1628-1694), médico italiano, descubrió los vasos capilares, la estructura microscópica del encéfalo y del nervio óptico y realizó estudios sobre la piel, así como en entomología y embriología. Su contribución fue la observación de los capilares, comunicaciones arteriovenosas del pulmón y ramificaciones bronquiales; fue el primero en estudiar tejidos vivos al microscopio, y es considerado el padre de la histología.

En 1590 dos artesanos holandeses, Zachary y Francis Janssen, inventaron el microscopio compuesto, que constaba de un tubo con dos lentes convexas en cada extremo y ampliaba más que las lupas que existían desde la Edad Media, aunque daba una imagen borrosa. En 1611 Johaness Kepler sugirió la manera de fabricar un microscopio compuesto. En 1665 Robert Hooke (1635-1703) publicó su libro *Micrographia,* y utilizó un microscopio compuesto para estudiar cortes de corcho, en los que describió los pequeños poros en forma de caja a los que él llamó células (celdas), pequeños cuartos; estos compartimentos en el corcho estaban vacíos porque las células se habían desintegrado; la palabra citología deriva del griego *kytos*, que significa hueco, vacío. El holandés Anton van Leeuwenhöek es el creador del mi-

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

croscopio simple y el fundador de la bacteriología. Examinó por primera vez los eritrocitos y descubrió que el semen está compuesto de espermatozoides. Describió tres tipos de bacterias: bacilos, cocos y espirilos. En 1771, Xavier Bichat propuso el término tejido para designar las estructuras constituyentes de los organismos, observadas en las salas de disección anatómica. Décadas más tarde, en 1819, August Carl Mayer propuso el término histología para designar a la ciencia que estudia los tejidos descritos por Bichat, a la que anteriormente se consideraba un apartado de la anatomía general. La idea de generación espontánea fue refutada de manera definitiva por Louis Pasteur (1822–1895). En 1840, Jacob Henle (1809-1885), fundador de la anatomía microscópica, publicó sus investigaciones de patología, adelantándose a la era bacteriológica; sostenía la teoría de *contagium animatum*: la materia infecciosa consiste en seres animados (vivos).

Durante el siglo XVIII se lograron objetivos acromáticos por asociación de vidrios *flint* y *crown* obtenidos en 1729 por Chester Moor Hall y mejorados por John Dollond (1706-1761). En 1828, William Nicol desarrolló la microscopia con luz polarizada, y en 1849 John Thomas Quekett publicó un tratado práctico sobre el uso del microscopio. Fue en 1838, casi 175 años después de las primeras observaciones de Hooke, que Matthias Schleiden (1804-1881) y Theodor Schwann (1810-1882), biólogos alemanes, propusieron lo que se conoce como teoría celular, y declararon que la célula nucleada es la unidad estructural y funcional en plantas y animales. Juntos enunciaron los siguientes postulados:

1. La célula es la unidad anatómica y estructural que constituye a todos los seres vivos.
2. La célula es la unidad fisiológica de los seres vivos.

En 1858, Rudolf Ludwig Karl Virchow (1821-1902), científico y también alemán, enunció el tercer postulado: *omnis cellula e cellula*.

3. Las células tienen su origen en otra célula semejante y se forman por la división celular de la misma.

Gregor Johann Mendel (1822-1884) determinó los rasgos heredables en los caracteres de los progenitores, hoy llamados genes. En 1893, Wilhelm His (1863-1934) descubrió el haz de musculatura cardiaca específica que lleva su nombre, y seis años después documentó anatómicamente el primer caso de bloqueo de Adams-Stokes. Ernst Karl Abbe (1840-1905), físico de la Universidad de Jena, Alemania, desarrolló en 1876 la teoría del microscopio, según la cual los grandes aumentos son inútiles si la imagen de difracción no se reduce suficientemente a expensas de la apertura numérica del objetivo. En 1881 Gustav von Retzius describió con gran detalle gran número de tejidos animales en el microscopio de luz. En las siguientes dos décadas, Santiago Ramón y Cajal (1852-1934) y otros histólogos desarrollan nuevos métodos de tinción y pusieron los fundamentos de la anatomía microscópica moderna. Jan Evangelista Purkinje (1787-1869), inventor del microtomo, describió en 1825 la vesícula germinal del huevo de las aves, y en 1836 las formaciones esféricas del cerebro y del cerebelo, que describió como estructuras homólogas. Carl Zeiss (1816-1888) fabricó en 1886 una serie de lentes, diseñados por Abbe en los límites teóricos de la luz visible. Hacia finales del siglo XIX fueron identificados los principales organelos que se conocen ahora. El término ergastoplasma (retículo endoplasmático) se introdujo en 1897; la mitocondria fue observada por varios autores, y fue nombrada así por Carl Benda (1857–1933) en 1898, el mismo año en que Camillo Golgi (1843–1926) descubrió el aparato que lleva su nombre. En 1879, Walther Flemming, empleando el colorante de hematoxilina, descubrió que sólo teñía de azul el núcleo; tiñó unos pequeños gránulos que estaban en el interior del núcleo y los llamó cromatinas. Flemming también observó y descubrió la división longitudinal cromosómica que ocurre durante el proceso de la mitosis, y acuñó este término. La palabra cromosoma fue usada por primera vez por Wilhelm Waldeyer (1836–1921) en 1888 durante la metafase.

En 1908, August Köhler y Henry Siedentopf desarrollaron el microscopio de fluorescencia, y en 1930 Lebedeff diseñó y construyó el primer microscopio de interferencia. En 1936, Fritz Zernike inventó el microscopio de contraste de fases. En 1937, Ernst Ruska y Max Knoll, físicos alemanes, construyeron el primer microscopio electrónico. Nomarski, en 1952, inventó y patentó el sistema de contraste diferencial de interferencia para el microscopio de luz.

MICROSCOPIO DE CAMPO CLARO

Es un tubo provisto de dos lentes que amplían sucesivamente la imagen del objeto. La lente próxima al objeto se denomina lente objetivo; la otra lente se sitúa cerca del ojo del observador y recibe el nombre de lente ocular; en lugar del ojo se puede colocar una cámara y así

www.elsolucionario.org

obtener fotografías de lo que se está observando. El microscopio compuesto es un instrumento óptico que se emplea para aumentar o ampliar las imágenes de objetos y organismos no visibles a simple vista.

El microscopio óptico común está conformado por tres sistemas:

1. **El sistema mecánico** está constituido por una serie de piezas en las que van instaladas las lentes que permiten el movimiento para el enfoque.
2. **El sistema óptico** comprende un conjunto de lentes dispuestas de tal manera que producen el aumento de las imágenes que se observan a través de ellas.
3. **El sistema de iluminación** comprende las partes del microscopio que reflejan, transmiten y regulan la cantidad de luz necesaria para efectuar la observación a través del microscopio.

Partes de un microscopio

La parte mecánica del microscopio comprende el pie, el tubo, el revólver, el estativo, la platina, el carro, el tornillo macrométrico y el tornillo micrométrico. Estos elementos sostienen la parte óptica y de iluminación; además, permiten los desplazamientos necesarios para el enfoque del objeto.

1. **Pie.** Constituye la base sobre la que se apoya el microscopio, y por lo general tiene forma de "Y", o bien es rectangular.
2. **Tubo o cañón.** Es un tubo largo de metal hueco de forma cilíndrica, y es oscuro en la superficie interior para evitar las molestias que ocasionan los reflejos de la luz. En su extremidad superior se colocan los oculares. Proporciona sostén al lente ocular y los lentes objetivos.
3. **Revólver.** Es una pieza giratoria provista de orificios en los cuales se enroscan los objetivos. Al girar el revólver, los objetivos pasan por el eje del tubo y se colocan en posición de trabajo.
4. **Columna, llamada también asa, estativo o brazo.** Es una pieza colocada en la parte posterior del aparato. Sostiene el tubo en su porción superior y por el extremo inferior se adapta al pie.
5. **Platina.** Plataforma metálica provista de pinzas donde se coloca el objeto o preparación que se va a observar. En el eje óptico del tubo presenta un orificio que permite el paso de los rayos luminosos. La platina puede ser fija, en cuyo caso permanece inmóvil; en otros casos puede ser giratoria, es decir, puede centrarse o producir movimientos circulares mediante tornillos laterales.
6. **Carro.** Es un dispositivo colocado sobre la platina que permite deslizar la preparación con movimiento ortogonal de adelante hacia atrás y de derecha a izquierda.
7. **Tornillo macrométrico.** Perilla de gran tamaño que, al ser girada, permite acercar o alejar el objeto que se está observando, ya que asciende o desciende el tubo del microscopio, deslizándose en sentido vertical gracias a una cremallera. Estos movimientos largos permiten el enfoque rápido de la preparación.
8. **Tornillo micrométrico.** Permite afinar la imagen enfocándola y haciéndola más clara mediante movimientos casi imperceptibles que produce al deslizar el tubo o la platina. Lleva acoplado un tambor graduado en divisiones de 0.001 mm que se utiliza para precisar sus movimientos y puede medir el espesor de los objetos.

El sistema óptico es el encargado de reproducir y aumentar las imágenes mediante el conjunto de lentes que lo componen. Lo integran los oculares y los objetivos.

1. **Lentes oculares.** Son en los que el observador aproxima el ojo. Los oculares están constituidos generalmente por dos lentes, dispuestos sobre un tubo corto. Los más utilizados son los de 8, 10, 12.5 y 15 X. La X se utiliza para expresar los aumentos en forma abreviada.
2. **Lentes objetivos.** Son grupos de tres a seis lentes ubicados en el revólver. Los objetivos producen aumento de las imágenes de los objetos y se hallan cerca de la preparación que se examina. Los utilizados comúnmente son de dos tipos: objetivos secos y de inmersión.
   - **a.** Los secos se utilizan sin necesidad de colocar sustancia alguna entre ellos y la preparación. En la cara externa llevan una serie de índices que refieren el aumento que producen, la apertura numérica y otros datos. Por ejemplo, si un objetivo tiene estos datos: plan 40/0.65 y 160/0.17, significa que es planacromático, su aumento es de 40 y su apertura numérica de 0.65, calculada para una longitud de tubo de 160 mm. El número de objetivos varía según el microscopio y su uso. Los aumentos de los objetivos secos más frecuentemente utilizados son: 4, 10, 20, 40 y 60 X.
   - **b.** El objetivo de inmersión está compuesto por un complicado sistema de lentes. Para observar a través de este objetivo es necesario colocar una

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

gota de aceite de cedro entre el objetivo y la preparación, de manera que la lente frontal entre en contacto con el aceite de cedro. Estos objetivos generalmente son de 40, 63 y 100 X; se distinguen por uno o dos círculos o anillos de color negro que rodean su extremo inferior.

El sistema de iluminación tiene como finalidad dirigir la luz natural o artificial de tal manera que ilumine la preparación u objeto que se va a observar en el microscopio. Comprende los siguientes elementos:

1. **Espejo.** Tiene dos caras: una cóncava y otra plana. Goza de movimientos en todas las direcciones. La cara cóncava se emplea de preferencia con iluminación artificial y la plana para iluminación natural (luz solar). En la actualidad se prescinde del espejo en la fabricación de microscopios, ya que éstos traen incorporada una lámpara colocada en su eje.
2. **Condensador.** El condensador está formado por un sistema de lentes cuya finalidad es concentrar los rayos luminosos sobre el plano de la preparación. Se halla debajo de la platina y puede deslizarse sobre un sistema de cremallera mediante un tornillo que determina su movimiento ascendente o descendente.
3. **Diafragma.** Regula la cantidad de luz que pasa a través del objeto en observación. El condensador generalmente está provisto de un diafragma-iris que regula su abertura y controla la calidad de luz que debe pasar a través del condensador.
4. **Fuente luminosa.** Refleja la luz hacia la platina.

TIPOS DE MICROSCOPIOS

Microscopio óptico

Es el tipo de microscopio más empleado; utiliza la luz visible de 500 nm (verde-amarilla) para crear una imagen aumentada del objeto (figura 9-1). El microscopio óptico más simple es la lente convexa doble con una distancia focal corta. Estas lentes pueden aumentar un objeto hasta 15 veces. Por lo general se utilizan microscopios compuestos, que disponen de varias lentes con las que se consiguen aumentos mayores. Algunos microscopios ópticos pueden aumentar un objeto hasta 2 000 veces. El microscopio compuesto consiste en dos sistemas de lentes: el objetivo y el ocular, y los demás componentes descritos anteriormente. Cuando se mira a través del ocular se ve una imagen virtual aumentada de la imagen real. El aumento total del microscopio depende de las longitudes focales de los dos sistemas de lentes, objetivo por ocular por optovar (un factor del tubo que generalmente es 1).

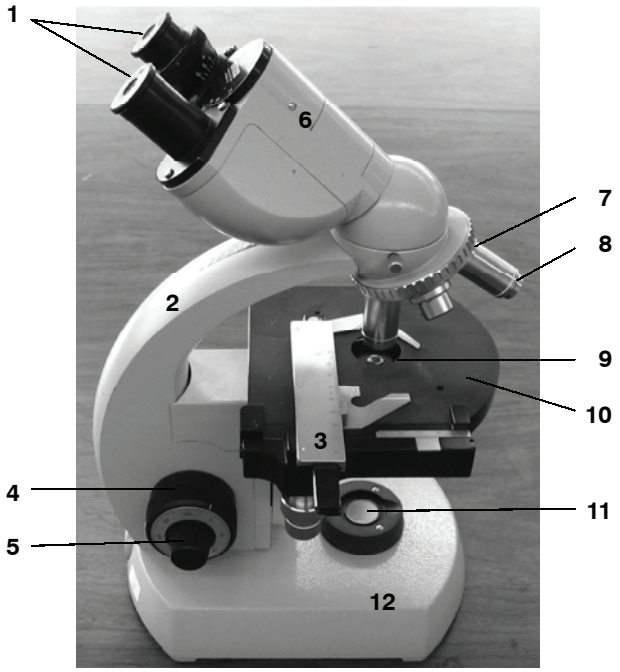


Figura 9-1. Fotografía de un microscopio óptico común. Este modelo corresponde a un microscopio binocular de Carl Zeiss. ***1.*** Oculares. ***2.*** Estativo. ***3.*** Carro. ***4.*** Tornillo macrométrico. ***5.*** Tornillo micrométrico. ***6.*** Tubo. ***7.*** Revólver. ***8.*** Objetivo. ***9.*** Condensador. ***10.*** Platina. ***11.*** Diafragma. ***12.*** Pie.

La fotomicrografía consiste en fotografiar objetos a través de un microscopio; utiliza una cámara montada por encima del ocular del microscopio. La cámara suele carecer de objetivo, ya que el microscopio actúa como tal. El término microfotografía, mal utilizado a veces en lugar de fotomicrografía, se refiere a una técnica de duplicación y reducción de fotografías y documentos a un tamaño minúsculo para guardarlos en un archivo.

Microscopio estereoscópico

Consiste en un par de microscopios de baja potencia unidos y colocados de forma que convergen en el espécimen (figura 9-2). El microscopio estereoscópico hace posible la visión tridimensional de los objetos. Consta de dos tubos oculares y dos objetivos pares para cada aumento. Este microscopio ofrece ventajas para observaciones que requieren pequeños aumentos. El nivel óptimo de visión estereoscópica se encuentra entre 2 y 40 X.

www.elsolucionario.org

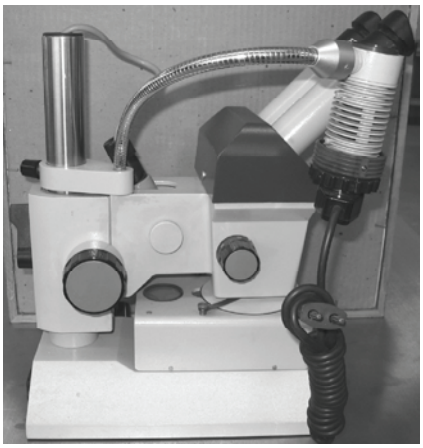


Figura 9-2. Fotografía de un microscopio estereoscópico de Carl Zeiss.

Microscopio de luz ultravioleta

Utiliza el rango ultravioleta del espectro luminoso en lugar del rango visible, bien para aumentar la resolución con una longitud de onda menor o para mejorar el detalle, absorbiendo selectivamente distintas longitudes de onda de la banda ultravioleta a 250 nm. Dado que el vidrio no transmite las longitudes de onda más cortas de la luz ultravioleta, los elementos ópticos de estos microscopios están hechos de cuarzo, fluorita o sistemas de espejos aluminizados. Además, dado que la radiación ultravioleta es invisible, la imagen se muestra con fluorescencia, en fotografía o con un monitor.

Microscopio petrográfico o de polarización

Se utiliza para identificar y estimar cuantitativamente los componentes minerales de las rocas ígneas y las rocas metamórficas. Cuenta con un prisma para polarizar la luz que pasa a través del espécimen examinado. Otro prisma Nicol o analizador determina la polarización de la luz que ha pasado a través del espécimen. El microscopio tiene un soporte giratorio que indica el cambio de polarización acusado por la muestra.

Microscopio en campo oscuro

Utiliza una luz muy intensa en forma de un cono hueco concentrado sobre el espécimen. El campo de visión del objetivo se encuentra en la zona hueca del cono de luz y sólo recoge la luz que se refleja en el objeto. Por ello las porciones claras del espécimen aparecen como un fondo oscuro y los objetos minúsculos que se están analizando aparecen como una luz brillante sobre el fondo. Esta forma de iluminación se utiliza para analizar elementos biológicos transparentes y sin manchas, invisibles con iluminación normal. Este microscopio está provisto de un condensador ovalado, que hace que los rayos luminosos no penetren directamente en el objetivo, sino que iluminan oblicuamente la preparación.

Microscopio de contraste de fases

Se basa en las modificaciones de la trayectoria de los rayos de luz o desfasamiento de las ondas sinusales, las cuales producen contrastes notables en la preparación. Se utiliza en tejidos no coloreados, y se obtienen datos cualitativos.

Ilumina el espécimen con un cono hueco de luz, como en el microscopio en campo oscuro. Sin embargo, en el microscopio de fase, el cono de luz es más estrecho y entra en el campo de visión del objetivo, que contiene un dispositivo en forma de anillo que reduce la intensidad de la luz y provoca un cambio de fase de un cuarto de la longitud de onda. Este tipo de iluminación provoca variaciones minúsculas en el índice de refracción de un espécimen transparente, haciéndolo visible. Este tipo de microscopio es muy útil a la hora de examinar tejidos vivos, por lo que se utiliza con frecuencia en biología y medicina.

Microscopio de interferencia o contraste interferencial diferencial (DIC)

Conocido como Nomarski o con modificaciones de Varell. Se basa en principios similares al anterior, pero tiene la ventaja de proporcionar resultados cuantitativos; se pueden determinar cambios en el índice de refracción y las variaciones de fase se pueden reflejar en cambios de color. En la variante de Nomarski, el rayo luminoso, tras atravesar el objeto por medio de un prisma birrefringente, se divide en dos rayos polarizados.

Microscopio de luz polarizada

Se basa en la propiedad de ciertas sustancias (anisótropas) que tienen distinto índice de refracción según la dirección que se considere, y puede estudiar moléculas. Contiene dos filtros polarizantes: polarizador y analizador. Las estructuras isótropas no dividen la luz polariza-

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

da plana (que sólo vibra en un plano), pero las estructuras anisótropas son birrefringentes.

Microscopio de campo cercano

Se pueden ver detalles menores a la longitud de onda de la luz. Se hace pasar un haz de luz a través de un orificio diminuto y se proyecta a través del espécimen a una distancia equivalente a la mitad del diámetro del orificio, formando una imagen completa.

Microscopio de fluorescencia

Para el análisis de las células y tejidos con fluorescencia propia o que han sido tratados con colorantes fluorescentes (fluorocromos o fluoróforos) se utiliza el microscopio de fluorescencia; su característica fundamental es la incorporación de una lámpara, que excita al fluorocromo, y un filtro especial, que presenta altos valores de transmisión para las ondas emitidas (figura 9-3). La fluorescencia es la propiedad que tienen algunas sustancias de emitir luz propia cuando inciden sobre ellas radiaciones energéticas. El tratamiento del material biológico con fluorocromos facilita la observación al microscopio. Uno de los problemas de la utilización de fluorocromos en microscopia de fluorescencia es la pérdida progresiva de ésta debido a las grandes intensidades de luz empleadas. Las muestras empleadas en esta técnica no pueden ser observadas durante largos periodos de tiempo debido a la desaparición de la fluorescencia, aunque se han desarrollado métodos que permiten reducir este efecto, como el uso de reactivos protectores de la fluorescencia (*antifading reagents*), el uso de fluorocromos con poco *fading*, el empleo de luz de excitación de menor intensidad, la reducción de la concentración de oxígeno en el espécimen, el direccionamiento de 100% de la luz hacia el dispositivo de registro (cámara o película) para reducir al máximo el tiempo de exposición y el empleo de mecanismos de medición de la exposición óptima (automática) para reducir la iluminación al máximo. Los reactivos *antifading* son moléculas que aportan al fluorocromo aquellos electrones que ha perdido por la emisión fluorescente. Los reactivos *antifading* más empleados son los siguientes:

Figura 9-3. Fotografía de un fotomicroscopio de epifluorescencia tipo Axioscop® de Carl Zeiss. Este equipo cuenta con cámara fotográfica de 35 mm, la cual se observa en la parte superior del microscopio. La lámpara de mercurio HBO 100 para epifluorescencia se ubica en la parte posterior (a la derecha de la fotografía).

1. **VECTASHIELD®.** Es el medio de montaje más utilizado.
2. **P-fenilendiamina.** Es el reactivo más efectivo para la conservación de la fluorescencia de la fluoresceína (FITC). También es efectivo para la rodamina (TRITC). Se emplea a 0.1% en glicerol/PBS. El reactivo se tiñe de blanco cuando se expone a la luz. Se ha de conservar en la oscuridad. El contacto con la piel es extremadamente peligroso.
3. **DABCO (1,4-diazabiciclo-2,2,2-octano).** Es muy efectivo para la fluoresceína, aunque menos que la P-fenilendiamina. Es menos sensible a la luz y es mucho menos tóxico.
4. **N-propilgalato.** Es el agente más efectivo para la rodamina, aunque también lo es para la fluoresceína. Se emplea a 0.1% en glicerol/PBS.
5. **2-mercaptoetilamina.** Se emplea para la observación de cromosomas y muestras de DNA teñidas con yoduro de propidio (PI), naranja de acridina (AO) o cromomisina A3. Se emplea al 0.1 mM en Tris-EDTA.

Microscopio electrónico (ME)

Funciona mediante el bombardeo de electrones y permite obtener imágenes ampliadas de la muestra, las cuales se proyectan sobre un monitor. El ME puede aumentar la imagen de un objeto entre 50 000 y 1 000 000 veces. La potencia amplificadora de un microscopio óptico está limitada por la longitud de onda de la luz visible. El microscopio electrónico utiliza electrones para iluminar un objeto. Dado que los electrones tienen una

www.elsolucionario.org

longitud de onda mucho menor que la de la luz, pueden mostrar estructuras mucho más pequeñas. La longitud de onda más corta de la luz visible es de 4 000 ángstroms (1 ángstrom equivale a 0.0000000001 metros). La longitud de onda de los electrones que se utilizan en los microscopios electrónicos es de alrededor de 0.5 ángstroms.

Todos los microscopios electrónicos cuentan con varios elementos básicos. Disponen de un cañón de electrones que emite estas partículas que chocan contra el espécimen, creando una imagen aumentada. Se utilizan lentes magnéticas para crear campos que dirigen y enfocan el haz de electrones, ya que las lentes convencionales utilizadas en los microscopios ópticos no funcionan con los electrones. El sistema de vacío es una parte relevante del microscopio electrónico. Los electrones pueden ser desviados por las moléculas del aire, de forma que tiene que hacerse un vacío casi total en el interior de un microscopio de estas características.

El microscopio electrónico consta esencialmente de:

1. Un filamento de tungsteno (cátodo), que emite electrones.
2. Condensador o lente electromagnética, que concentra el haz de electrones.
3. Objetivo o lente electromagnética, que amplía el cono de proyección del haz de luz.
4. Ocular o lente electromagnética, que aumenta la imagen.
5. Proyector o lente proyectora, que amplía la imagen.
6. Pantalla fluorescente, que recoge la imagen para hacerla visible al ojo humano.

Existen dos tipos básicos de microscopios electrónicos: el microscopio electrónico de transmisión (TEM, por las siglas en inglés de *Transmission Electron Microscope*, o MET) y el microscopio electrónico de barrido (SEM, por las siglas en inglés de *Scanning Electron Microscope*, o MEB) (figura 9-4).

Microscopio electrónico de transmisión (MET)

Utiliza electrones acelerados, y tiene un poder de resolución de 0.2 nm (el del ojo humano es de 0.2 mm a 25 cm), por lo que se puede aumentar un objeto hasta un millón de veces. El filamento, o cátodo, es calentado y emite electrones. Mediante una lente electromagnética, los electrones son concentrados en el objeto; una segunda lente electromagnética funciona como lente objetivo; la tercera lente es el proyector, que actúa de ocular, volviendo a ampliar la imagen y proyectándola sobre una pantalla. Un MET dirige el haz de electrones hacia el objeto que se desea aumentar. Una parte de los electrones rebotan o son absorbidos por el objeto, y otros lo atraviesan, formando una imagen aumentada del espécimen.

Para utilizar un MET deben hacerse cortes de las muestras de 60 a 90 nm de grosor en el ultramicrotomo. Se coloca una placa fotográfica o una pantalla fluorescente detrás del objeto para registrar la imagen aumentada.

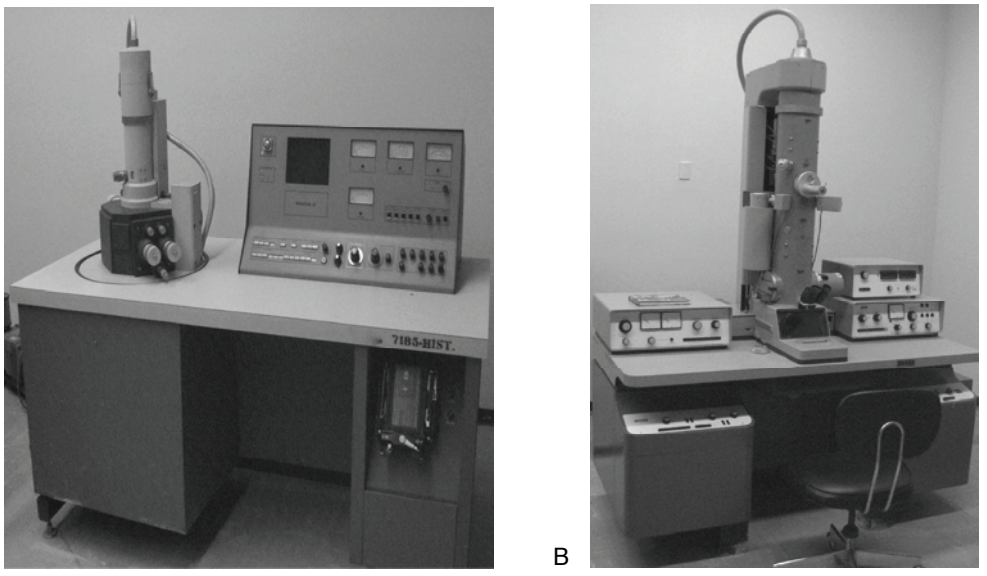


Figura 9-4. Microscopios electrónicos. ***A.*** Microscopio electrónico de barrido (MEB). ***B.*** Microscopio electrónico de transmisión (MET) Carl Zeiss EM-10®.

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

Microscopio electrónico de barrido (MEB)

Trabaja como un microscopio electrónico de transmisión, sólo que en éste no hay lente proyectora, sino un detector de electrones que proyecta la imagen fuera del tubo, sobre un monitor. La muestra se recubre con átomos de oro y platino mediante sombreado metálico; su principal utilidad es la observación de la superficie de las células, de sus organelos y sus componentes tisulares.

Un MEB crea una imagen ampliada de la superficie de un objeto, y no es necesario cortarlo en capas para observarlo, sino que puede colocarse en el microscopio con muy pocos preparativos.

El MEB explora la superficie de la imagen punto por punto y produce imágenes tridimensionales realistas de la superficie del objeto, a diferencia del MET, que examina una gran parte de la muestra cada vez.

Su funcionamiento se basa en recorrer la muestra con un haz muy concentrado de electrones, de forma parecida al barrido de un haz de electrones por la pantalla de un monitor. Los electrones del haz pueden dispersarse de la muestra o provocar la aparición de electrones secundarios. Los electrones perdidos y los secundarios son recogidos y contados por un dispositivo electrónico situado a los lados del espécimen. Cada punto leído de la muestra corresponde a un pixel en un monitor de televisión. Cuanto mayor sea el número de electrones contados por el dispositivo, mayor será el brillo del pixel en la pantalla. A medida que el haz de electrones barre la muestra, se presenta toda la imagen de la misma en el monitor. Los MEB pueden ampliar los objetos 100 000 veces o más (poder de resolución de 10 nm).

Microscopio electrónico de barrido y transmisión

También conocido como STEM, por las siglas en inglés de *Scanning Transmission Electron Microscope,* combina los elementos de un MET y un MEB, y puede mostrar los átomos individuales de un objeto.

Microanalizador de sonda de electrones

Es un microscopio electrónico que cuenta con un analizador de espectro de rayos X; puede analizar los rayos X de alta energía que produce el objeto al ser bombardeado con electrones. Dado que se puede conocer la identidad de los diferentes átomos y moléculas de un material utilizando sus emisiones de rayos X, los analizadores de sonda de electrones no sólo proporcionan una imagen ampliada de la muestra, como hace un microscopio electrónico, sino que suministran también información sobre la composición química del material.

Microscopio electrónico de alta aceleración

Tiene hasta diez metros de altura y pesa 22 toneladas. Los electrones se aceleran a través de un campo de un millón de voltios. Esto les confiere la energía cinética necesaria para atravesar muestras gruesas de hasta varios micrómetros de espesor.

Microscopio de efecto túnel o de sonda de barrido

En los microscopios de sonda de barrido se utiliza una sonda que recorre la superficie de una muestra, proporcionando una imagen tridimensional de la red de átomos o moléculas que la componen. La sonda es una afilada punta de metal que puede tener un grosor de un solo átomo en su extremo. Un tipo importante de microscopio de sonda de barrido es el microscopio de túnel de barrido (STM, por las siglas en inglés de *Scanning Tunelling Microscope*), desarrollado en 1981. Este microscopio utiliza un fenómeno de la física cuántica, denominado efecto túnel, para proporcionar imágenes detalladas de sustancias conductoras de electricidad. La sonda se coloca a una distancia de pocos ángstroms de la superficie del material y se aplica un voltaje pequeño entre la superficie y la sonda. A causa de la poca distancia entre el material y la sonda, algunos electrones se escapan a través del hueco, generando una corriente. La magnitud de la corriente del efecto túnel depende de la distancia entre la superficie y la sonda. El flujo de corriente es mayor cuando la sonda se acerca al material y disminuye cuando se aleja. A medida que el mecanismo de barrido mueve la sonda por encima de la superficie, se ajusta de modo automático la altura de la sonda para mantener constante la corriente del efecto túnel. Estos ajustes minúsculos permiten dibujar las ondulaciones de la superficie, y se crea en una computadora la representación tridimensional del material. Los materiales que pueden observarse con este tipo de microscopio tienen sus limitaciones; deben, por ejemplo, conducir la electricidad y ser elementos que no se oxiden, como el oro, el platino o el grafito, entre otros.

Microscopio de fuerza atómica *(Scanning Probe Microscope, SPM)*

Similar al del efecto túnel, usa una aguja muy fina situada al final de un soporte flexible para entrar en contacto

www.elsolucionario.org

con la muestra y detectar los efectos de las fuerzas atómicas. El resultado obtenido es parecido al del efecto túnel, pero sirve para materiales no conductores de electricidad. Este microscopio barre la superficie de la muestra utilizando un microsensor que permite una observación con gran ampliación en forma tridimensional. El término SPM corresponde a la técnica AFM (por las siglas en inglés de *Atom Force Microscope*), cuyas principales características son:

1. Observación fácil y con gran ampliación al aire.
2. Observación directa de muestras no conductivas.
3. Medición precisa en dirección Z (altura).

Se pueden obtener imágenes topográficas de las muestras con ampliaciones a partir de miles o millones de veces, siendo muestras típicas de esta técnica metales, cerámicas, materiales orgánicos y muestras biológicas, sin la necesidad de tratamientos de preparación tales como la metalización.

Microscopio confocal *(Laser scanning Confocal Microscopy, LSCM)*

En esencia, es un microscopio óptico que utiliza lásers como fuente luminosa, e incorpora dos diafragmas:

1. Un diafragma de iluminación localizado tras la fuente luminosa, denominado *pinhole* de excitación, para eliminar la luz proveniente de planos superiores e inferiores al plano focal, aumentando con ello la claridad y la resolución de la imagen.
2. Un diafragma de detección, de tamaño variable, situado delante del fotodetector, denominado *pinhole* de emisión.

Los factores que influyen en la obtención de una buena imagen son:

1. Alta precisión y velocidad en el barrido.
2. *Pinhole* continuamente variable.
3. Resolución hasta los 2 048 x 2 048 pixeles.
4. Controles independientes de las variables del microscopio, fotomultiplicador, amplificadores, filtros y configuraciones.
5. Un detector y un *pinhole* por canal.
6. Un filtro optoacústico para el control de cada láser.
7. Disminución del ruido.
8. Escaneos seriados para la realización del objeto en 3D.

El microscopio confocal se usa para detectar la expresión o localización de moléculas en dos o tres dimensiones y en varios canales al mismo tiempo, permitiendo reconstrucciones tridimensionales, tanto en cultivos celulares como en tejidos histológicos; en estudios de colocalización de proteínas u otro tipo de moléculas; para estudiar el transporte intracelular y endocitosis; para medir concentraciones de iones intracelulares; para analizar la expresión génica por hibridación *in situ* con sondas fluorescentes (FISH) o por inmunofluorescencia. En estos casos se usan fluorocromos o sustancias que tienen la propiedad de emitir un fotón de una longitud de onda determinada cuando captan (son excitados por) un fotón incidente de una longitud de onda característica (figura 9-5).

MANEJO DEL MICROSCOPIO ÓPTICO

Generalidades

El microscopio se debe tomar con ambas manos apoyando una en la base y otra en el estativo; al colocarlo sobre la mesa se debe alejar del borde para que no se caiga. Verificar que esté conectado a la corriente eléctrica y encendido. Se debe evitar en lo posible usar preparaciones sin cubreobjetos para no ensuciar o contaminar los objetivos que no son de inmersión. La limpieza de objetivos y oculares debe ser con un limpiador especial para lentes o con pañuelos suaves. Para limpiar el aceite de inmersión, primero se quita el exceso y posteriormen-

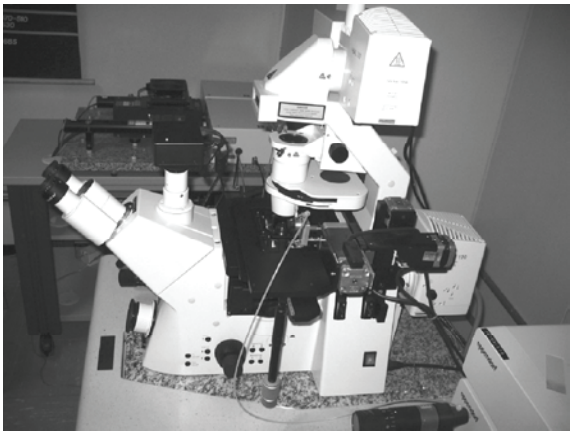


Figura 9-5. Microscopio confocal LSM 5 PASCAL® de Carl Zeiss, acoplado a un microscopio invertido (con el revólver bajo la platina) tipo Axiovert 200M®, con cámara digital de alta resolución HRC y sistema de micromanipulación.

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

te se puede usar alcohol a 70% para removerlo por completo.

Procedimiento

1. Se coloca el portaobjetos en la platina con la superficie donde está la muestra hacia arriba en el caso de un microscopio convencional, pero si es un microscopio invertido (con el revólver bajo la platina) el cubreobjetos debe quedar hacia abajo.
2. Se elige la región que se va a examinar y se centra lo más posible en el orificio de la platina, moviendo los tornillos que desplazan el carro en los dos ejes horizontales.
3. Se ajusta el sistema de iluminación para que llegue a la muestra la cantidad apropiada de luz.
4. Antes de enfocar, se baja el tubo del microscopio con el objetivo de bajo aumento (4 X o 10 X) en posición, girando el tornillo macrométrico hasta que el ocular quede aproximadamente a 0.5 cm de la preparación.
5. Para enfocar, se observa a través del ocular y se sube o baja lentamente el objetivo con el tornillo macrométrico, hasta que la muestra esté en foco; posteriormente se utiliza el tornillo micrométrico para el enfoque fino. Se debe tener precaución de no bajar el ocular excesivamente, porque puede romper el portaobjetos y dañar el lente del ocular al hacer contacto con la muestra.
6. Primero se observa la preparación a bajo aumento, después se van cambiando los objetivos de forma progresiva para obtener mayor aumento, rotando los lentes hasta que estén en su lugar.
7. Al usar el objetivo de inmersión en aceite (100 X) se sube el tubo con el objetivo de inmersión en aceite acoplado. Se coloca una gota de aceite de inmersión sobre la porción de la preparación que va a observarse. Se baja el tubo con lentitud hasta que el objetivo haga contacto con el aceite, sin tocar el portaobjetos. Esta delicada operación se realiza observando el microscopio lateralmente para hacerlo con precisión.

AJUSTE DE LA ILUMINACIÓN KÖHLER

La iluminación Köhler se compone de dos diafragmas: uno de campo situado a nivel de la lámpara y uno de iris o de apertura, situado debajo del condensador. La iluminación de Köhler no se deteriora por las imperfecciones o suciedad de la superficie del condensador.

Para realizar el ajuste de esta iluminación, se enfoca la muestra, se alinea el camino de la luz centrando la imagen del diafragma de campo iluminado, se interpone una lente de Bertrand entre el plano focal posterior del objetivo y el plano imagen intermedio y se enfoca la imagen del diafragma. Por último, se ajusta el diafragma de campo iluminado para que ilumine justo el campo de visión. La imagen del diafragma de campo es proyectada en el plano de la preparación por el condensador, el cual se desplazará verticalmente hasta conseguir una imagen lo más nítida posible del diafragma; la iluminación más nítida se consigue cuando el condensador se encuentra cerca de la muestra.

El diafragma de campo sirve para regular la apertura de la iluminación. Cerrando este diafragma se incrementan los contrastes y la profundidad de campo y disminuye el poder de resolución. Es importante asegurarse de que el filamento de la lámpara esté bien centrado con relación al condensador de la lámpara y que el haz esté bien dirigido por el espejo hacia la cara de entrada del condensador.

Para el uso del microscopio con resultados óptimos, es necesario que todo el sistema de iluminación esté enfocado de manera correcta. Esto permite, además de lograr imágenes más reales, proteger la vista de quien trabaja con el microscopio óptico o compuesto.

Para que en un microscopio se pueda realizar la iluminación Köhler es necesario que tenga diafragma de campo luminoso (dispuesto en el pie del microscopio o en la parte superior, si es microscopio invertido), condensador desplazable verticalmente y lámpara con colector y diafragma de iris o de apertura. Con este ajuste se calibra la iluminación del microscopio. Esta calibración se debe realizar cada vez que se usa el microscopio, ya que el ajuste se puede alterar si lo utilizan varias personas.

Procedimiento

1. Se enfoca la muestra con el objetivo de menor aumento (4, 6.3, 10 o 16 X).
2. Se sube completamente el portacondensador, con la lente frontal alineada; si se trata de un microscopio invertido, el portacondensador se baja al máximo.
3. Se cierra el diafragma de campo al máximo.
4. Se acerca el portacondensador hasta obtener la máxima nitidez de la imagen del diafragma de campo.

www.elsolucionario.org

5. El condensador está en posición correcta cuando se ven los anillos de Newton (se trata de un borde azul y rojo que aparece cuando dos superficies transparentes entran en contacto imperfecto; la imagen es una consecuencia del fenómeno de interferencia, cuando la separación entre las dos superficies es de magnitud comparable a la longitud de onda de la luz reflejada). El enfoque del objetivo corresponde al del condensador y, como los objetivos son parafocales (todos enfocan en el mismo plano focal), el ajuste de la iluminación Köhler aplica para todos ellos (figura 9-6).
6. Se centra el polígono que se observa en el campo visual, utilizando los tornillos de centrado del condensador.
7. Se cierra el diafragma de iris a apreciación personal (cuando la iluminación sobre la imagen sea nítida).
8. Se abre el diafragma de campo hasta que desaparece el polígono observado en el borde del campo visual.

AJUSTE PARA MICROMETRÍA

Para medir un objeto o muestra al microscopio, es necesario que éste esté ajustado, ya que el procedimiento exige gran precisión óptica. Para ajustarlo se necesita un micrómetro ocular, que es una pieza circular pequeña, y un micrómetro objetivo, que está montado sobre un portaobjetos.

Procedimiento

1. Revisar que el microscopio está en condiciones operables y que se encuentra encendido.
2. Cerciorarse de que las partes ópticas del microscopio se encuentran perfectamente limpias.
3. Destornillar la lente superior del ocular y acomodar en el interior el micrómetro ocular con la superficie donde está grabada la escala hacia arriba.
4. Colocar el micrómetro objetivo (regla de calibración) sobre la platina del microscopio, con el grabado hacia arriba.
5. Enfocar la escala del micrómetro ocular sobre la del micrómetro objetivo, de tal forma que las graduaciones de una queden paralelas con las de la otra y definidas de manera nítida.
6. Seleccionar en el extremo superior de las escalas dos divisiones (una de cada escala), y hacer que coincidan moviendo el carro de la platina.
7. Buscar hacia abajo otra línea del micrómetro ocular; debe coincidir exactamente con otra del micrómetro objetivo.
8. Contar el número de divisiones del micrómetro ocular y las del micrómetro objetivo que se encuentren entre las dos líneas que coinciden.

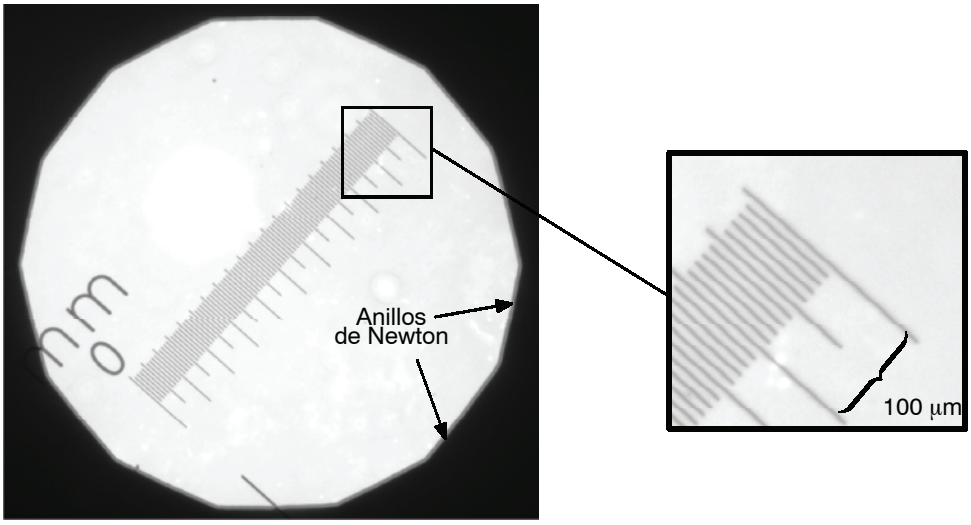


Figura 9-6. Fotografía de un micrómetro de 1 mm (Carl Zeiss) dividido en escalas de 10 μm con un total de 100 separaciones (1 000 μm. Este micrómetro se coloca de manera diagonal a 45° para tener ajuste perfecto entre el eje X (horizontal) y el Y (vertical). A la derecha se observa una ampliación de la escala del micrómetro. En este ejemplo se realizó una calibración para el objetivo 4 X con una resolución de 2 600 pixeles. En el polígono también se observan los anillos de Newton descritos anteriormente en el ajuste de la iluminación Köhler.

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

9. Se calcula el valor en mm de cada una de las divisiones del micrómetro ocular. Ejemplo: si la escala del micrómetro objetivo es de 1 mm con divisiones de 0.01 mm y se contaron 30 divisiones del micrómetro ocular y 25 del micrómetro objetivo, entonces cada división del ocular tendrá un valor de 25/30 x 0.01 = 0.0083 mm, o sea 8.3 μm.
10. Este procedimiento se realiza en todos los lentes objetivos del microscopio.

La calibración de micrometría para usar la cámara digital en la captura de imágenes en todos los objetivos es necesaria si se quiere hacer un análisis de imagen posterior o medir las estructuras observadas y capturadas en la fotografía. Para que esta calibración sea correcta se debe hacer para cada objetivo y para cada resolución disponible de la cámara por objetivo; en el caso de la cámara digital HRC (*high resolution camera*) de 4 megapixeles montada sobre el microscopio confocal de la figura 9-5, las calibraciones requeridas son las siguientes: objetivo 4 X, captura con resolución de 1 300, 2 600 y 3 900 pixeles. Objetivo 10 X, captura con resolución de 1 300, 2 600 y 3 900 pixeles. Objetivo 20 X, captura con resolución de 1 300, 2 600 y 3 900 pixeles. Objetivo 40 X, Ph1 seco, captura con resolución de 1 300, 2 600 y 3 900 pixeles. Objetivo 40 X, Ph2 inmersión, captura con resolución de 1 300, 2 600 y 3 900 pixeles. Objetivo 100 X, inmersión, captura con resolución de 1 300, 2 600 y 3 900 pixeles.

En total se realizan 15 calibraciones de micrometría, con la ventaja de que se realizan por una sola vez y se pueden guardar en archivo electrónico para que estén disponibles a requerimiento (figura 9-6).

AJUSTE PARA CONTRASTE DE FASES

1. Se sube completamente el portacondensador, con la lente frontal alineada; si se trata de un microscopio invertido, el portacondensador se baja al máximo.
2. Se enfoca la muestra con el objetivo de menor aumento (4, 6.3 o 10 X).
3. Se observa y se cierra el diafragma del microscopio.
4. Se aleja el portacondensador hasta obtener nitidez máxima de la imagen del diafragma.
5. Se alinea el diafragma de campo luminoso en el campo visual con los tornillos del condensador.
6. Se abre el diafragma de campo luminoso hasta el borde del campo visual.
7. Se intercala en el condensador el diafragma anular correspondiente al objetivo Ph.
8. Se sustituye el ocular por el microscopio auxiliar y se enfocan el anillo de fases y el diafragma anular.
9. Con los botones de ajuste del condensador, se hace coincidir el anillo de fases y el diafragma anular. Se coloca de nuevo el ocular.
10. Cuando se cambia el objetivo, se adapta el diafragma de campo luminoso al tamaño del campo visual y se intercala el diafragma anular correspondiente al objetivo; ejemplo: si el objetivo es Ph2, el condensador se coloca en la posición 2.

LIMPIEZA DEL MICROSCOPIO

Se realiza de manera periódica de la siguiente manera:

1. Desconectar el microscopio.
2. Limpiar con una franela ligeramente humedecida todo el cuerpo del microscopio, teniendo cuidado de no forzar ninguna de sus partes ni rayar la superficie.
3. Limpiar la platina y el condensador con una torunda de algodón impregnada de alcohol a 70%.
4. Las lentes objetivos se limpian con un algodón impregnado de alcohol a 70%; después se secan con otro algodón seco o con un pedazo de papel especial para evitar rayaduras en la lente.
5. El sistema de iluminación también debe limpiarse de forma externa con un algodón impregnado de alcohol a 70%.
6. Los filtros normales se limpian de la misma manera, excepto los de fluorescencia, que sólo tendrán mantenimiento especializado, ya que pueden rayarse.
7. Encender el microscopio y verificar que las lentes estén limpias (no deben observarse partículas extrañas); de lo contrario, repetir la operación de limpieza.
8. Una vez efectuada la limpieza del microscopio, deberá cubrírsele con su funda para evitar que se acumule el polvo.

Nota: todas las operaciones antes descritas deberán ser registradas en la bitácora del equipo; se anotará la fecha y el nombre del usuario que realizó el procedimiento. También se podrán anotar las observaciones pertinentes.

www.elsolucionario.org

Capítulo 10

Microscopia y técnicas complementarias

Dolores Javier Sánchez González, Dairo Jesús Orjuela Henry,
Luis Humberto Pérez Astudillo, Ismael Vásquez Moctezuma

MÉTODOS HISTOLÓGICOS

Técnica histológica

Introducción

La técnica histológica es un conjunto de métodos para la obtención de preparaciones histológicas que serán observadas al microscopio. Abarca varios procedimientos sobre tejidos, los cuales serán cortados y montados en un portaobjeto para microscopia óptica o rejilla para microscopia electrónica. En el ser humano, la muestra del tejido por estudiar se puede obtener de dos formas:

1. **Necropsia** (del griego *necros*, muerto, y *opsis*, visión): examen de tejidos de un organismo muerto.
2. **Biopsia** (del griego *bios,* vida, y *opsis,* visión). Examen u obtención de tejidos de un organismo vivo (paciente), y puede ser de varios tipos: sacabocado, punción, raspado, trepanación, incisional y escisional.

Otra fuente de material biológico del ser humano para la técnica histológica son células sueltas (citología), como en el caso de frotis o extendidos sanguíneos, exudado faríngeo, vaginal o de biopsias por aspiración, etc.

En animales de experimentación también se pueden obtener muestras de tejido por los métodos descritos, además de poderse realizar observación directa de células y tejidos vivos, y de estudiar material inanimado. Cabe destacar que la técnica histológica se puede aplicar también a todos los reinos de la vida (plantas, hongos, protozoarios, bacterias, etc.), ya que el objetivo es precisamente estudiar células y tejidos para su posterior observación y análisis al microscopio, previo montaje en laminillas histológicas. La laminilla o preparación histológica es una superficie plana y delgada de cristal en donde se encuentra montada una preparación de tejido permanente. Se compone de tres partes: portaobjetos, corte o tejido y cubreobjetos.

Los procedimientos de la técnica histológica son los siguientes:

Fijación

La fijación es un mecanismo que conserva la estructura celular y tisular. La mayor parte de las técnicas de tinción matan a las células. Los fijadores establecen entrecruzamientos entre las macromoléculas para que queden en su posición original, y también hacen a las células permeables a los colorantes. Esto se logra porque la fijación produce una precipitación o coagulación completa de las proteínas celulares, preservando el aspecto original, aunque de manera imperfecta. Por esta razón, la fijación del material histológico también puede provocar artefactos y alteraciones moleculares y estructurales en los tejidos. La mayoría de los fijadores son líquidos, pero puede haberlos sólidos, como el bicloruro de mercurio o sublimado corrosivo, que es de rápida penetración y precipita las proteínas.

Los mecanismos de acción de los fijadores son los siguientes:

1. Se reducen en contacto con las moléculas orgánicas y originan en su seno un precipitado suma-

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

mente fino (ácido ósmico, bicloruro de mercurio, cloruro de oro).
2. La mayor parte de los fijadores actúan como oxidantes, favoreciendo así la coloración ulterior de los tejidos reductores.
3. Coagulan las proteínas pero no se combinan con ellas (alcohol, ácido pícrico, yodo, calor).
4. Forman combinaciones químicas con moléculas orgánicas (ácido crómico y sus sales).

Los fijadores deben cumplir ciertas características ideales, como tener rápida penetración, coagular el contenido celular, proteger el tejido durante sus posteriores procesamientos y permitir que los componentes celulares mantengan sus características moleculares y estructurales.

Cualidades que deben tener los fijadores

1. Conservar, en lo posible, los detalles estructurales que presentaban *in vivo* las muestras biológicas.
2. Permitir o favorecer el empleo de los procedimientos necesarios para su observación ulterior (ejecución de cortes, coloración, etc.).
3. Impedir la desaparición de los elementos solubles durante la fijación o después de ella.
4. No provocar o impedir la producción de estructuras artificiales.
5. No retraer excesivamente los tejidos ni volverlos friables o quebradizos.
6. Actuar con rapidez, matando y fijando las células antes de que aparezcan los cambios *post mortem* (autólisis, desintegración, etc.).
7. Poseer alto poder de penetración para asegurar la fijación correcta hasta en las capas profundas de la pieza por fijar.

Existen fijadores físicos y químicos:

Fijadores físicos

Entre éstos se encuentran la desecación, la congelación, el calor húmedo y seco, y el frío. El calor seco se aplica solamente a extendidos celulares o frotis, con buenos resultados, mientras que el frío endurece, aunque en sentido estricto no es un fijador verdadero: sólo retrasa o suspende los cambios tisulares debidos a la necrosis.

Fijadores químicos

Son los fijadores verdaderos y los más utilizados para prevenir efectos *post mortem,* como autólisis y putrefacción de los tejidos, así como para mejorar la afinidad tintorial de los mismos. Existen los ácidos minerales (ácido crómico, ácido ósmico, etc.), ácidos orgánicos (ácido acético, ácido pícrico, etc.), sales metálicas de metales pesados (bicromatos, cloruro mercúrico, etc.) y reductores orgánicos (alcohol etílico, metanol, formol, acetona, etc.). Los más utilizados son los derivados aldehídicos, como formaldehído, paraformaldehído, glutaraldehído y acroleína. También se usan dietilpirocarbonato (DEPC), carbodiimida, imidatos, benzoquinonas, etc.

Los fijadores químicos producen cambios fisicoquímicos en las estructuras celulares; sin embargo, tienen el inconveniente de ser tóxicos, corrosivos, de olor penetrante y con efectos irritantes sobre la piel y mucosas ocular y respiratoria, lo que constituye un riesgo laboral. Estos fijadores pueden ser fijadores simples, cuyo contenido es una sola sustancia química, y fijadores compuestos, también llamados mezclas fijadoras cuando varias sustancias intervienen en su constitución.

El tamaño de la muestra a fijar es variable, pero se recomienda de entre 1 y 3 cm (figura 10–1). En este proceso, los tejidos se tratan con fijadores químicos que tienen varios efectos:

1. Interrumpir los procesos celulares dinámicos de necrosis celular y tisular.
2. Conservar los tejidos para que tengan el mayor parecido posible a su estado *in vivo*.
3. Incrementar la dureza y consistencia del tejido para facilitar la obtención de cortes finos.
4. Destruir y eliminar microorganismos que puedan alterar los tejidos.

Los fijadores inactivan enzimas líticas que generan autólisis y ocasionan degeneración *post mortem.* La fijación también preserva las estructuras tisulares al estimular la formación de enlaces cruzados entre las proteínas.

Figura 10–1. Obtención de muestras de tejido para su fijación e inicio de la técnica histológica. El tamaño de la muestra es variable, pero se recomienda de entre 1 y 3 cm para la técnica de parafina.

www.elsolucionario.org

Regla de oro para la fijación

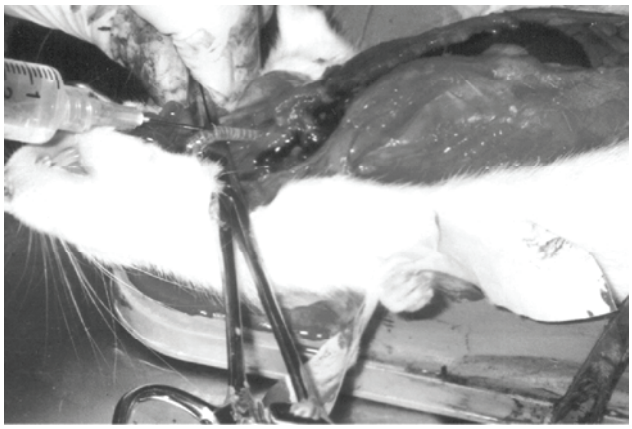
La mejor fijación es cuando ha pasado el menor tiempo posible entre la muerte del tejido y la fijación.

La fijación puede ser de dos maneras:

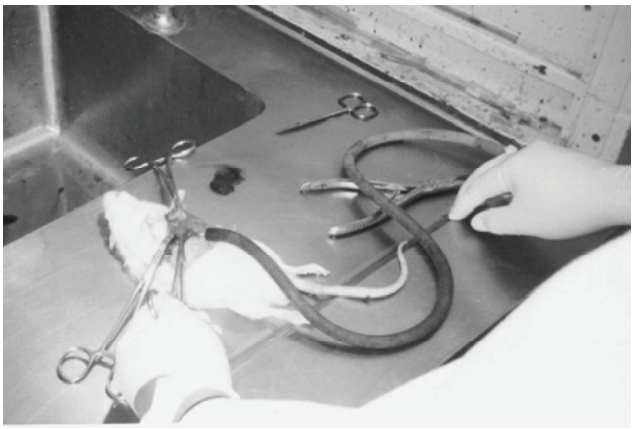
1. **Inmersión.** Se colocan las muestras de tejido directamente en el líquido fijador a razón de 1:10, respectivamente.
2. **Perfusión.** Mediante este procedimiento se perfunde el fijador en el animal anestesiado. La ventaja de este procedimiento es que sigue la regla de oro y se garantiza que se preserven mejor los tejidos de interés. Puede ser de dos tipos (figura 10-2):
   a. **Intratraqueal.** El líquido fijador se perfunde directamente en la luz de la tráquea hasta insuflar los pulmones, luego se hace una jareta en el extremo distal de la tráquea para evitar la salida del fijador y que los pulmones se desinflen.
   b. **Intracardiaca.** Es el método de elección para una perfusión sistémica. El catéter se inserta en el ápex cardiaco hasta el ventrículo izquierdo, para garantizar que el líquido fijador fluya a través de la aorta. El fijador es impulsado por una bomba de perfusión o por simple gravedad, elevando el contenedor a una altura suficiente del animal (1 a 2 m).

Fijadores más utilizados

1. Formol a 10%.
2. Formol neutro a 10% (amortiguado).
3. Carnoy.
4. Regaud.
5. Zenker.



A



B

C

D

Figura 10-2. Fijación. ***A.*** Intratraqueal. Se muestra el procedimiento de perfusión con jeringa de 5 mL (volumen pulmonar aproximado de una rata). ***B.*** Se muestra la técnica de perfusión intracardiaca en ratas. ***C.*** Detalle de la bomba de perfusión. ***D.*** El autor trabajando la técnica en el laboratorio de cirugía experimental de la Escuela Médico Militar, Universidad del Ejército y Fuerza Aérea (UDEFA), México.

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

6. Bouin.
7. Bouin tricloroacético.

Deshidratación

Después de que las muestras han sido fijadas, se elimina el fijador y se deshidrata. Las piezas, al ser retiradas del fijador o después de haber sido lavadas, están hidratadas (contienen agua), y esto impide que sean penetradas por la parafina. Por esta razón, el agua debe ser extraída de las muestras sumergiéndolas en líquidos anhidros, ávidos de agua. Para evitar alteraciones provocadas por una deshidratación brusca, se recomienda hacerlo de forma escalonada utilizando, preferentemente, alcohol etílico de graduación creciente (en algunos casos especiales también se usa acetona). La aplicación gradual de soluciones acuosas será de menor a mayor concentración del agente deshidratante. Se inicia con alcohol a 50%, luego con una solución de 60, 70, 80, 90 y 96%, alcanzando de manera paulatina el alcohol absoluto a 100% para eliminar el agua. Esto se realiza de manera progresiva, porque si se colocara el tejido en una solución a 100% de alcohol de manera súbita, el agua saldría muy rápidamente del tejido, deformándolo.

Impregnación por un disolvente de la parafina (aclaramiento o diafanización)

Las piezas perfectamente deshidratadas se pasan a una solución de una sustancia miscible tanto con el alcohol como con el medio de inclusión por utilizar (en la mayoría de los casos se utiliza parafina líquida como medio de inclusión). La sustancia comúnmente utilizada es toluol, xileno o xilol. De la misma manera, se coloca la muestra de tejido en un recipiente de xilol; éste sólo es soluble en alcohol a 100%. Se llama aclaramiento, ya que el tejido se torna transparente o claro en el xileno; esto se debe a que cambia su índice de refracción. También se puede utilizar tolueno, benzol o cloroformo como medio de aclaramiento. Al agregar el agente aclarante no debe aparecer ninguna turbidez. Si se torna blanco-lechoso es que la deshidratación no se ha realizado bien, y se debe repetir el baño de alcohol absoluto cerciorándose de que realmente lo sea: una gota de alcohol agregada a unos mililitros de xilol no debe enturbiarlo. También se debe tener precaución al usar alcohol y xileno, ya que disuelven los lípidos de los tejidos y, si se quieren preservar, se recomienda usar fijadores físicos, como la congelación (criopreservación).

Infiltración

La deshidratación, aclaramiento e infiltración son pasos subsecuentes que remueven el agua de los tejidos y los preparan para la inclusión (formación del bloque). Con el fin de obtener cortes lo suficientemente finos para ser vistos al microscopio, los tejidos deben incluirse en una sustancia de consistencia firme. Las sustancias más utilizadas para este fin son la gelatina, la nitrocelulosa (celoidina) y la parafina. En este paso de la técnica histológica, el medio de inclusión se debe infiltrar en estado líquido al tejido, pues disuelve el medio de aclaramiento y penetra en el tejido (la parafina líquida a 60 °C desplaza al xilol del tejido). Por lo general, se coloca la muestra de tejido en un recipiente y se le agrega la parafina fundida (punto de fusión de 56 a 58 °C), mantenida líquida en la estufa a no más de 62 °C. Después de 1 a 2 h se renueva la parafina. Debido al calor, el xilol se evapora, y los espacios anteriormente ocupados por él son ahora ocupados por la parafina (figura 10-3).

Inclusión

Después de la infiltración se coloca la pieza y un poco de parafina fundida en moldes metálicos (barras de Leuckart), se vierte la parafina fundida al mismo punto de fusión que la que ha servido para la infiltración. Se colocan las muestras orientándolas correctamente y se deja solidificar a temperatura ambiente o en plataforma

Figura 10-3. Proceso de infiltración. La muestra de tejido se coloca en la parafina fundida "1" a 60 °C. Después de 1 a 2 h se cambian las muestras a la parafina "2". Debido al calor, el xilol se evapora, y los espacios anteriormente ocupados por éste son ahora ocupados por la parafina.

www.elsolucionario.org

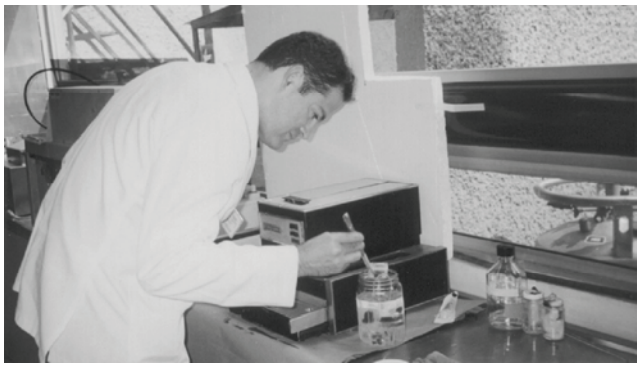


Figura 10-4. Procedimiento de inclusión. Después de la infiltración, se coloca la pieza y un poco de parafina fundida en moldes metálicos. Se colocan las muestras orientándolas correctamente y se deja solidificar a 4 °C. El autor en el laboratorio de patología experimental del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán", México.

fría especial a 4 °C. A los 15 a 30 min, la parafina se habrá solidificado completamente, formándose un bloque sólido de parafina con el trozo de tejido incluido (figura 10-4). A este bloque también se le denomina taco, y ya puede utilizarse para realizar los cortes con el microtomo.

El objeto de la inclusión es:

a. Tener un bloque o taco con la consistencia suficiente para su manejo y corte.
b. Distinguir entre sí las células superpuestas en un tejido y la matriz extracelular mediante el microscopio.

Es importante etiquetar los bloques de parafina antes de que endurezca la parafina (figura 10-5). Para microscopia electrónica, comúnmente se utilizan resinas polimerizadas (epoxi), como epon o araldita, las cuales son los medios de inclusión más comunes.

Obtención de secciones o cortes y microtomía

Los cortes de tejido deben ser lo suficientemente delgados como para permitir el paso de la luz y poder visualizarlos al microscopio. Los microtomos son aparatos que realizan cortes delgados parejos y de espesor graduable con gran precisión. Por lo general, el espesor del corte oscila entre 3 y 6 μm. Existen cinco tipos de microtomos: tipo Minot, de congelación, crióstato o criotomo, de deslizamiento y ultramicrotomo.

1. **Tipo Minot.** En estos equipos, la cuchilla es fija, el bloque con la muestra sujeta a una platina se desliza verticalmente al hacer girar una manivela. Los cortes que se obtienen son seriados en forma de cinta (figura 10-6).
2. **Tipo congelación.** Es similar al microtomo de deslizamiento, pero la cuchilla gira sobre un eje. Asimismo, el equipo contiene un sistema de congelación colocado debajo de la platina que utiliza el anhídrido carbónico contenido en un cilindro, con el cual se comunica como fuente de congelación.
3. **Crióstato.** Este aparato contiene un microtomo tipo Minot incluido en una cámara de congela-

A B

Figura 10-5. ***A.*** Mesa de trabajo de corte por microtomía. ***B.*** Detalle de los bloques de parafina con la muestra en su interior, perfectamente bien rotulados y listos para ser cortados. Los bloques fueron preparados en el laboratorio de biología celular y tisular de la Escuela Médico Militar, Universidad del Ejército y Fuerza Aérea (UDEFA), México.

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

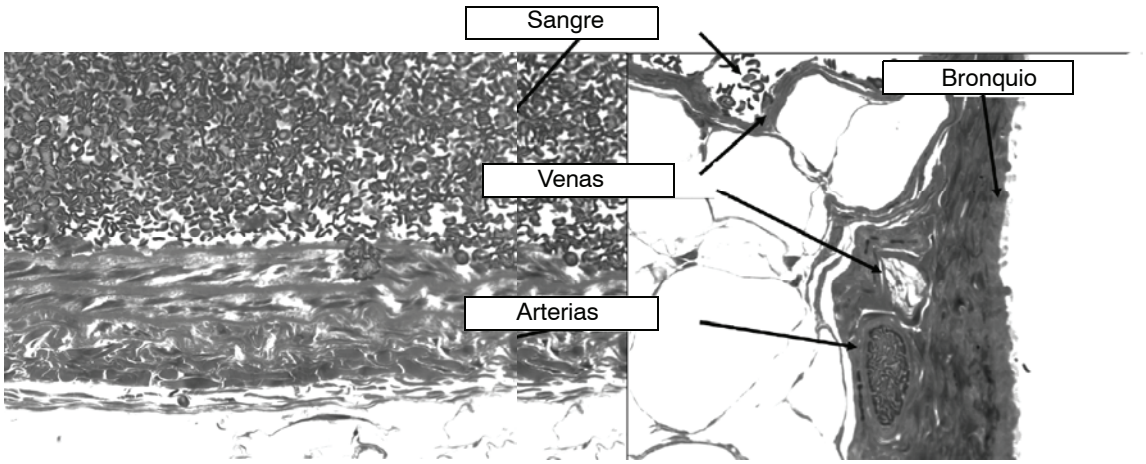
A B

Figura 10-6. Realización del corte de bloques de parafina en un microtomo tipo Minot. ***A.*** El autor en el laboratorio de patología experimental del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán". ***B.*** Detalle de un microtomo tipo Minot.

ción. La manivela que controla la realización del corte se encuentra en el exterior, mientras que la cuchilla y el mecanismo de avance están situados dentro de la cámara fría a -20 °C. Pese a la disposición horizontal de la cuchilla, la obtención de cortes seriados se realiza debido a la existencia de un sistema antienrollamiento que obliga al corte a deslizarse sobre la superficie de la cuchilla. En modelos recientes se tiene la opción de realizar cortes manuales o automáticos y de enfriar rápidamente la muestra a -60 °C gracias a la existencia de una placa de congelación instantánea. El crióstato tiene la ventaja de permitir la obtención de cortes muy delgados (de entre 2 y 4 μm).

4. **Tipo deslizamiento.** En este equipo, la muestra queda fija mientras la cuchilla se desliza de manera horizontal por unas guías especiales ancladas a un soporte al que va sujeta.
5. **Ultramicrotomo.** Este equipo se utiliza para realizar cortes para microscopia electrónica; sin embargo, previo a los cortes definitivos se realizan unos cortes intermedios, denominados cortes semifinos, de 400 a 600 nm de grosor, los cuales se tiñen con azul de toluidina para poder observarlos al microscopio de luz (figura 10-7).

Posteriormente se delimita el área de interés de la cual se obtendrán los cortes finos definitivos.



A B

Figura 10-7. Fotografías de cortes semifinos de 0.450 μm de grosor en tejido pulmonar incluido en plástico (resina Epon®) y teñidos con azul de toluidina. 400 X. ***A.*** Arteria pulmonar. ***B.*** Bronquio.

www.elsolucionario.org

Figura 10-8. Se muestra el procedimiento de silanización. Se diluyen 2 mL de silano en 48 mL de acetona absoluta (4%), cantidad suficiente para un vaso de Coplin de 50 mL con capacidad para 13 portaobjetos colocados en zigzag. Laboratorio de patología experimental del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán".

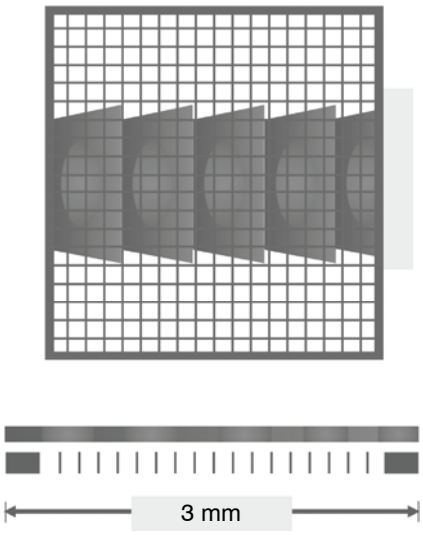


Figura 10-9. Esquema de una rejilla donde se montan los cortes finos de tejidos para ser procesados y observados al microscopio electrónico. Las rejillas pueden ser de cobre o de níquel, y miden 3 mm de diámetro. En el esquema se muestran cuatro tejidos en la rejilla.

Después de obtener del microtomo los cortes de parafina, se extienden en agua tibia a 40 °C (aproximadamente) contenida en un baño de flotación. En ese mismo baño de agua se introducen los portaobjetos, previamente cubiertos de una capa de adhesivo, y a continuación se pescan o levantan sobre el portaobjetos con ayuda de una aguja histológica. Los adhesivos más comunes para recubrir los portaobjetos son: gelatina, albúmina de Mayer, Poli L-Lisina® y silano (figura 10-8).

Si se desea estudiar grasas o lípidos que se extraen en el proceso de aclaramiento o enzimas que se inactivan por el calentamiento de la inclusión, se debe utilizar la técnica de congelación de tejidos, los cuales, al estar congelados, son lo suficientemente duros para cortarse de manera adecuada. En esta técnica, la muestra biológica fresca se sumerge en nitrógeno líquido para tener una congelación rápida (-196 °C). Posteriormente se puede cortar con un microtomo de congelación o crióstato. Una ventaja adicional con esta técnica es que permite obtener cortes de forma rápida que se pueden utilizar para el diagnóstico de biopsias transoperatorias tomadas en intervenciones quirúrgicas. El resultado se obtiene aproximadamente en media hora durante el transcurso de la cirugía. Para microscopia electrónica se requieren cortes muy delgados, denominados ultrafinos, de aproximadamente 50 a 100 nm de grosor y 500 nm de diámetro. Para este propósito se utiliza un ultramicrotomo con cuchilla de vidrio o diamante. Una vez obtenidos los cortes, se pescan en el espejo de agua de la cuchilla y se montan sobre rejillas de cobre o níquel de 3 mm de diámetro (figura 10-9).

Tinción

Este paso es el que sigue después del corte y captura del tejido en el portaobjetos. La parafina se elimina en el xilol que actúa como solvente orgánico; este paso se denomina desparafinación. Posteriormente, la muestra se rehidrata haciéndola pasar por una serie de graduaciones decrecientes de alcohol etílico, hasta llegar a una solución 100% de agua. Una vez rehidratado el tejido, se tiñe con los colorantes deseados. Los más comunes son la hematoxilina y la eosina (HE). Después de la tinción se vuelve a deshidratar para aclarar otra vez con xilol, y posteriormente montar el cubreobjeto de modo permanente con resina Entellan® o similar.

Los colorantes se agrupan en tres clases:

1. Colorantes especializados que distinguen los componentes fibrosos de la matriz extracelular.
2. Colorantes que diferencian los componentes ácidos y básicos de la célula.
3. Sales metálicas que se precipitan en los tejidos y forman depósitos de metales con ellos.

Montaje

Terminado todo el proceso de tinción, la muestra se deshidrata con los mismos alcoholes de graduaciones crecientes descritos en el paso de deshidratación, y se pro-

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

cede a la aclaración con xilol y montaje definitivo. La resina de montaje Entellan® es soluble en xilol y es de secado rápido, con un índice de refracción semejante al del vidrio. Para el montaje se limpia el portaobjetos alrededor de la muestra, y se deposita sobre el mismo una gota de resina disuelta en xilol; se cubre con un cubreobjeto y se deja secar unos minutos antes de su observación al microscopio.

Los medios de montaje pueden ser miscibles o no miscibles en agua (hidrosolubles o no). Si son hidrosolubles, ya no es necesaria la deshidratación después de la tinción, se puede montar directamente. Se puede usar como medio de montaje hidrosoluble el glicerol, o el VECTASHIELD® en caso de fluorescencia; además, se deberá cubrir el borde del cubreobjeto con esmalte para uñas o Rubber Cement® para fijar el cubreobjeto con el portaobjetos y evitar que escurra el medio de montaje.

El cubreobjetos no sólo protege el tejido, también se requiere para observar el corte al microscopio.

TIPOS DE COLORANTES

Los colorantes son las sustancias que pueden conferir color a otros objetos, o tejidos, en este caso, mientras que la coloración es el proceso mediante el cual un objeto se tiñe por un colorante, sin perder el color, cuando es lavado con el disolvente utilizado al preparar la solución colorante.

Los colorantes se clasifican según su origen en:

Colorantes naturales

Éstos, a su vez, se dividen por su origen: animal, como el carmín, y vegetal, como la orceína, la hematoxilina, el azafrán, etc.

Colorantes artificiales o sintéticos (colores de anilina)

1. **Ácidos.** Incluyen sales cuya base es incolora y su ácido es coloreado (como la eosina o eosinato de sodio). De manera característica tiñen citoplasma.
2. **Básicos.** Incluyen sales cuya base es coloreada y el ácido es incoloro, como el azul de metileno o clorhidrato de azul de metileno. De manera característica tiñen núcleo.
3. **Neutros.** Incluyen sales en las que tanto el ácido como la base son coloreados. Tienen la propiedad de teñir el núcleo de un color y el citoplasma de otro.
4. **Indiferentes.** Estos colorantes no forman sales, sólo tiñen aquellas sustancias que tienen un poder disolvente superior al del líquido que ha servido para preparar la solución colorante, como los colorantes Sudán lll y rojo escarlata.

Por otra parte, las coloraciones se clasifican en:

1. **Ortocromática.** Los tejidos coloreados adquieren un color igual que el de la solución colorante empleada.
2. **Metacromática.** Con estos colorantes, ciertas moléculas o componentes celulares se tiñen de un color diferente al del colorante empleado.

Métodos de coloración

1. **Coloración progresiva.** Por este método se deja actuar al colorante hasta que llegue a su punto óptimo.
2. **Coloración regresiva.** Por este método se realiza primero una sobretinción y luego se elimina el exceso de colorante por medio de diferenciadores. Este proceso recibe el nombre de diferenciación o viraje.
3. **Coloración simple.** Por este método se colorean solamente algunos elementos del tejido preparado (citoplasma, núcleo, fibras elásticas, etc.).
4. **Coloración directa.** Por este método existe una verdadera afinidad entre el colorante y el tejido.
5. **Coloración indirecta.** Este método requiere la intervención de intermediarios o mordentes para que la tinción se realice.
6. **Coloración combinada.** Por este método se tiñen los elementos nucleares y citoplasmáticos de manera combinada. Se emplean colorantes básicos y ácidos que contrastan por sus colores.
7. **Coloración panóptica.** Este método de tinción también utiliza una combinación sucesiva, pero de colorantes neutros como May-Grünwald-Giemsa.
8. **Coloración pancrómica.** En este método se utilizan juntos, en un solo baño, todos los colorantes neutros que se necesiten.

Los colorantes más utilizados en histología humana son la hematoxilina y la eosina (HE).

www.elsolucionario.org

Hematoxilina

Es un colorante de origen vegetal que requiere ser oxidado previamente para poder ser utilizado. Los agentes oxidantes pueden ser el aire tras varios meses de exposición u oxidantes artificiales (como el óxido rojo de mercurio, permanganato de potasio, dicromato potásico, etc.). Se puede utilizar como colorante directo, pero generalmente se usa como un colorante indirecto combinado con alumbre de potasio o de sodio como mordentes.

Eosina

La eosina es un colorante artificial que se obtiene de derivados hidroxixanténicos halogenados con tres grupos arilo que presentan autofluorescencia espontánea permanente si se observan con filtros adecuados de fluorescencia (520 a 550 nm de longitud de onda). Se usa en soluciones acuosas y en alcohólicas. Es el otro componente importante de la batería de tinción para la técnica de HE.

Fundamentos químicos de la tinción

El ojo puede diferenciar variaciones de intensidad de la luz (contraste entre luz y sombras) y de color (longitudes de onda). Con las tinciones histológicas se logra una absorción diferencial de la luz. La eosina es un colorante ácido y sus propiedades tintoriales se explican porque estos colorantes se unen a los componentes básicos del citoplasma, mientras que la hematoxilina, que sin ser colorante básico tiene propiedades muy semejantes a las anilinas básicas, tiñe con gran afinidad a los ácidos nucleicos. La acidofilia (del griego *filein,* amar) es la capacidad de teñir que tienen los colorantes ácidos (aniónicos), mientras que la basofilia es la propiedad de los colorantes básicos (catiónicos). Los primeros forman enlaces iónicos o electrostáticos con moléculas de carga positiva, mientras que los segundos forman enlaces con moléculas de carga negativa. Las bases son sustancias capaces de aceptar protones, mientras que los ácidos donan protones hidrógeno.

Colorantes básicos

Son moléculas de anilina que tienen una o más cargas positivas en su porción coloreada; su fórmula general se representa como anilina^{+} Cl^{-}. Estos colorantes reaccionan con los grupos aniónicos de los grupos fosfato de los ácidos nucleicos, los grupos sulfato de los glicosaminoglicanos y los grupos carboxilo de las proteínas. La reacción de estos grupos varía según el pH del medio. Cuando la hematoxilina se coloca en agua, se adhiere con firmeza al tejido y permanece firmemente adherida.

Los colorantes básicos verdaderos no se utilizan seguidos por uno ácido, ya que la anilina básica tiende a disociarse del tejido durante los lavados posteriores en soluciones acuosas. Cualquier componente de los tejidos que reaccione con un colorante básico o con hematoxilina se denomina basófilo (que tiene basofilia). Estos componentes son:

1. Heterocromatina y nucleolos del núcleo por los grupos fosfato ionizados.
2. Ergastoplasma (RER) por grupos fosfato ionizados.
3. Matriz cartilaginosa debida a grupos sulfato ionizados.
4. Ribosomas.

Colorantes ácidos

Contienen una carga negativa en la porción coloreada de la molécula, y su fórmula general se representa como Na^{+} anilina^{-}.

Los colorantes ácidos se unen a sus blancos por medio de enlaces electrostáticos de manera similar, pero opuesta a la de los colorantes básicos. Las anilinas ácidas reaccionan con grupos catiónicos, como los grupos amino ionizados de las proteínas.

Los componentes que se tiñen con colorantes ácidos debido a grupos amino ionizados se denominan acidófilos (que tienen acidofilia). Estos componentes son:

1. La mayor parte del citoplasma no especializado.
2. Filamentos citoplasmáticos (citoesqueleto).
3. Fibras y matriz extracelular.

Metacromasia

Su nombre deriva del griego *meta,* variación, y *kroma,* color. Es el fenómeno mediante el cual un colorante cambia de color al reaccionar con un componente tisular; algunos de los colorantes que presentan este fenómeno son el azul de toluidina y la tionina (derivados tiazínicos).

Esto se presenta porque en tejidos con altas concentraciones de polianiones el colorante se polimeriza entre sí, y sus propiedades de absorción cambian respecto a las propiedades de las moléculas individuales. Por esta razón, la metacromasia refleja gran cantidad de cargas

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

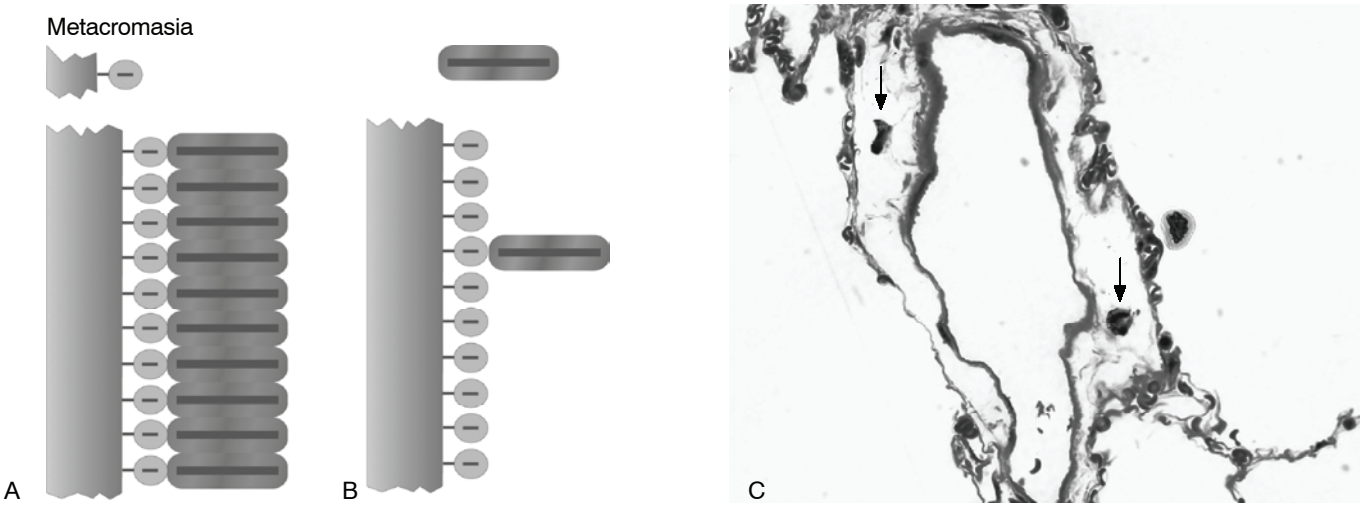


Figura 10-10. Esquema de la metacromasia y la ortocromasia. Cuando las moléculas de colorante se agrupan en los polianiones, se presenta una coloración roja (metacromasia) ***(A),*** pero si se encuentran dispersas, entonces el tejido adquiere una coloración azul ***(B)*** (ortocromasia). ***C.*** Se muestran dos leucocitos (flechas) metacromáticos en torno a una vena pulmonar. Azul de toluidina. 400 X.

aniónicas cercanas unas a otras en el tejido, como es el caso de la sustancia fundamental del cartílago y los gránulos de los mastocitos, donde el azul de toluidina los tiñe de color púrpura, siendo que su color natural es el azul.

Los componentes tisulares que tienen la propiedad de colorearse metacromáticamente se denominan cromotropos. Ejemplos de éstos son los glicosaminoglicanos sulfatados y las nucleoproteínas (figura 10-10).

TÉCNICAS COMUNES DE TINCIÓN EN HISTOLOGÍA

Técnica de hematoxilina y eosina (HE)

a. Después de obtenido el corte se procede a desparafinar e hidratar de la siguiente manera:
  1. Colocar los portaobjetos con el corte en la estufa a 58 °C durante 15 min a 1 h.
  2. Pasar por xilol 1 durante 5 min.
  3. Pasar por xilol 2 durante 5 min.
  4. Colocar en alcohol de 100° por 3 min.
  5. Sumergir en alcohol de 96° por 3 min.
  6. Pasar por alcohol de 80° durante 3 min.
  7. Pasar por alcohol de 70° durante 3 min.
  8. Pasar por agua destilada durante 3 min para hidratar completamente.

b. Batería de tinción (figura 10-11):
  1. Hematoxilina, durante 5 a 10 min.
  2. Agua corriente, por 1 min.
  3. Carbonato de litio a 0.5% para virar el color.
  4. Agua corriente, por 30 seg.
  5. Alcohol ácido, una sumergida rápida (menos de 1 seg) para remover el exceso de hematoxilina.
  6. Agua corriente, por 30 seg.
  7. Alcohol de 50°, por 30 seg.
  8. Eosina, por 30 seg.

c. Batería para deshidratación y aclaramiento:
  1. Sumergir en alcohol de 70° durante 3 min.
  2. Sumergir en alcohol de 96° durante 3 min.

Figura 10-11. Batería de tinción para la técnica de hematoxilina y eosina (HE), ubicada en el laboratorio de biología celular y tisular de la Escuela Médico Militar, Universidad del Ejército y Fuerza Aérea (UDEFA), México.

www.elsolucionario.org

Figura 10-12. Observación al microscopio de luz compuesto. Este complejo microscopio Carl Zeiss con sistema confocal LSM 5 Pascal® y micromanipulación fue donado a la Escuela Médico Militar por la Fundación Gonzalo Río Arronte. Laboratorio de microscopia confocal de la Escuela Médico Militar, Universidad del Ejército y Fuerza Aérea (UDEFA).

3. Colocar en alcohol de 100° durante 3 min.
4. Colocar en alcohol de 100° durante 3 min.
5. Sumergir en xilol 1 durante 3 min.
6. Sumergir en xilol 2 durante 5 min.

d. Montaje con resina Entellan®:
1. Limpiar el portaobjetos alrededor del corte.
2. Depositar sobre el mismo una gota de resina Entellan® disuelta en xilol.
3. Cubrir con un cubreobjeto.
4. Dejar secar entre 10 y 30 min antes de su observación al microscopio (figura 10-12).

Observación esperada: núcleos de color morado. Tejido conectivo y citoplasma de color rosa.

Coloraciones tricrómicas

Este grupo de métodos de tinción emplea diversos colorantes sobre un esquema general de tratamiento previo o simultáneo con ácidos fosfotúngstico y fosfomolíbdico, ya que las fibras del tejido conectivo tienen afinidad por estas sustancias. Posteriormente se fijan los colorantes sulfonados de aminotrifenilo a través de sus grupos amino. Estos métodos incluyen técnicas en las que se emplea una secuencia de ácidos y colorantes, y otras en las que ambos componentes se usan juntos. Los fijadores que se recomiendan para este tipo de tinciones son la solución saturada acuosa de cloruro mercúrico, el ácido pícrico saturado alcohólico y el fijador de Bouin. Entre las tinciones tricrómicas más frecuentes están:

1. Tricrómica de Masson. Observación esperada: núcleos de color morado, colágeno de color verde o azul según el colorante utilizado, citoplasma de color rosa.
2. Tricrómica de Gomori. Observación esperada: núcleos de color azul a negro, colágeno de color azul, citoplasma y fibras musculares de color rojo.
3. Tricrómica de Mallory. Observación esperada: núcleos de color rojo, colágeno de color azul, citoplasma de color rosa violáceo, hematíes (eritrocitos) de color naranja.
4. Tricrómica de Gallego. Observación esperada: núcleos de color rojo, colágeno y citoplasma de color verde, hematíes de color amarillo.
5. Tricrómica de Cajal. Observación esperada: núcleos de color rojo, colágeno de color azul, citoplasma de color amarillo o rosa, moco de color naranja.

Métodos basados en la reacción de Schiff para grupos aldehído

El reactivo de Schiff es la leucofucsina o bisulfato de fucsina que se forma de la reacción entre bisulfito y rojo fucsina. En su estado natural es incoloro, pero puede formar un color rojo estable por la adición de grupos aldehído. Este compuesto se utiliza en combinación con otros productos químicos para las técnicas de tinción de:

1. Método del ácido peryódico de Schiff (PAS). Se utiliza para determinar la presencia de moléculas como el glucógeno, glicoproteínas y glicosaminoglicanos. También sirve para identificar membranas basales y fibras reticulares. Actúa rompiendo la unión de los anillos de las hexosas y formando grupos aldehído. También rompe los enlaces de las hexoaminas de los glicosaminoglicanos y forma grupos aldehído para hacerlos reaccionar con el reactivo de Schiff. Su mecanismo de acción se debe a que el ácido peryódico (HIO_4) oxida los grupos hidroxilo de dos átomos de carbono adyacentes y los transforma en grupos aldehído. También rompe la unión entre los átomos de carbono deteniendo la oxidación (figuras 10-13 y 10-14). Para microscopia electrónica se emplea una modificación de la reacción de PAS denominada método PAS-plata. Después de la oxidación con ácido peryódico se emplea el reactivo metenamina-plata, para obtener un contraste electrodenso.
2. Método de Feulgen. Es un método de tinción específico para la determinación histoquímica del

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

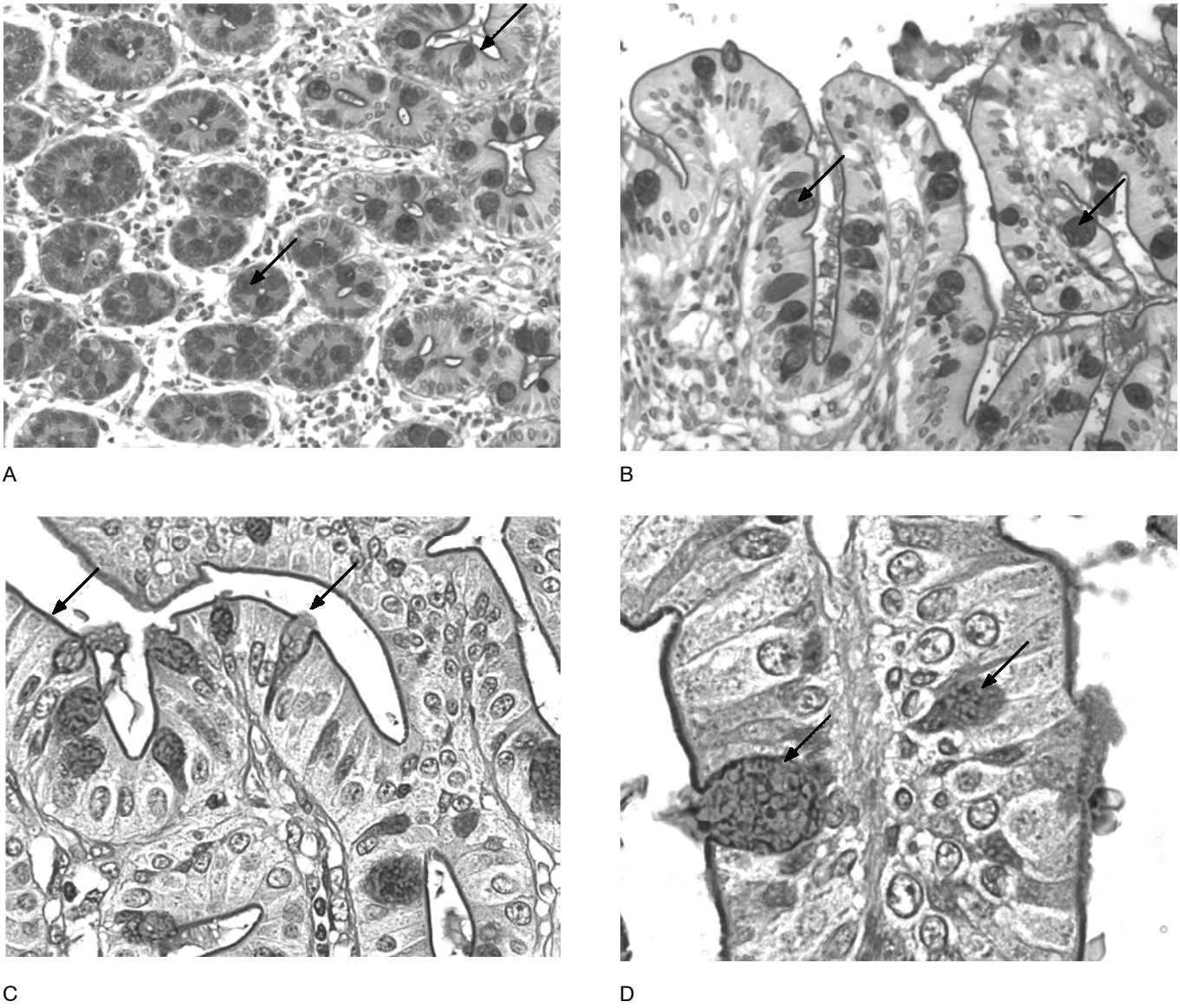


Figura 10-13. Fotografías de células caliciformes (flechas) en intestino delgado. Existe una reacción intensa en rojo ante la tinción de PAS. ***A*** y ***B.*** 200 X. ***C.*** 400 X y ***D.*** 1 000 X. En estas glándulas unicelulares, la secreción mucinosa desplaza al núcleo hacia la base de la célula, deformándolo. Su extremo apical está ensanchado en forma de copa.

DNA. Los grupos púricos del DNA se separan mediante la hidrólisis ácida débil; de esta forma se abre el anillo de desoxirribosa y se forma un grupo aldehído que reacciona con el reactivo de Schiff. El RNA no se tiñe con este procedimiento. El resultado obtenido es un color magenta o rojo.

Determinación histoquímica de lípidos

Para esta tinción se realizan cortes por congelación, por lo que se evita extraer los lípidos con los solventes orgánicos. Los colorantes más empleados son los Sudán, que son casi insolubles en agua.

El colorante Sudán se diluye en un solvente orgánico en el cual los lípidos y triglicéridos sean relativamente insolubles, y en el que también el colorante sea sólo parcialmente soluble. El colorante debe ser más soluble en lípidos que en el solvente, ya que la coloración tiene lugar porque las moléculas del colorante se distribuyen entre los lípidos y el solvente en relación con su solubilidad en ambos.

Para evitar la extracción del colorante y los lípidos, después de la coloración se montan los cortes en medios hidrosolubles.

www.elsolucionario.org

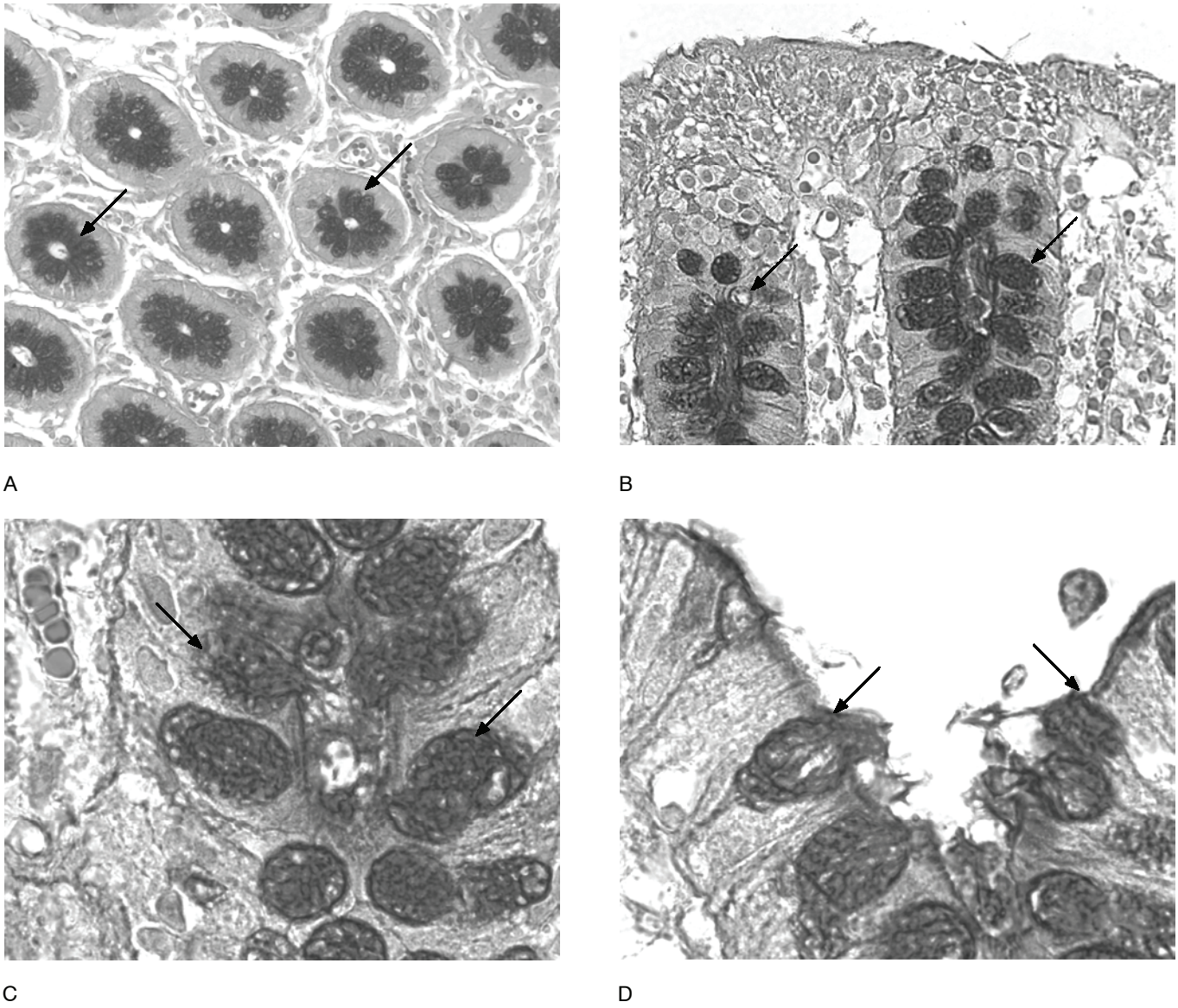


Figura 10-14. Fotografías de células caliciformes (flechas) en intestino grueso. Se observa la reacción intensa en azul para mucina. Tinción de azul alciano. ***A.*** 200 X. ***B.*** 400 X. ***C*** y ***D.*** 1 000 X.

El colorante rojo de Sudán, o Sudán III, tiñe células adiposas; el colorante negro de Sudán, o Sudán IV, se emplea en la coloración de las vainas de mielina de las fibras nerviosas.

EXAMEN CITOLÓGICO

El examen citológico emplea dos métodos: el examen inmediato y el examen mediato.

Examen inmediato

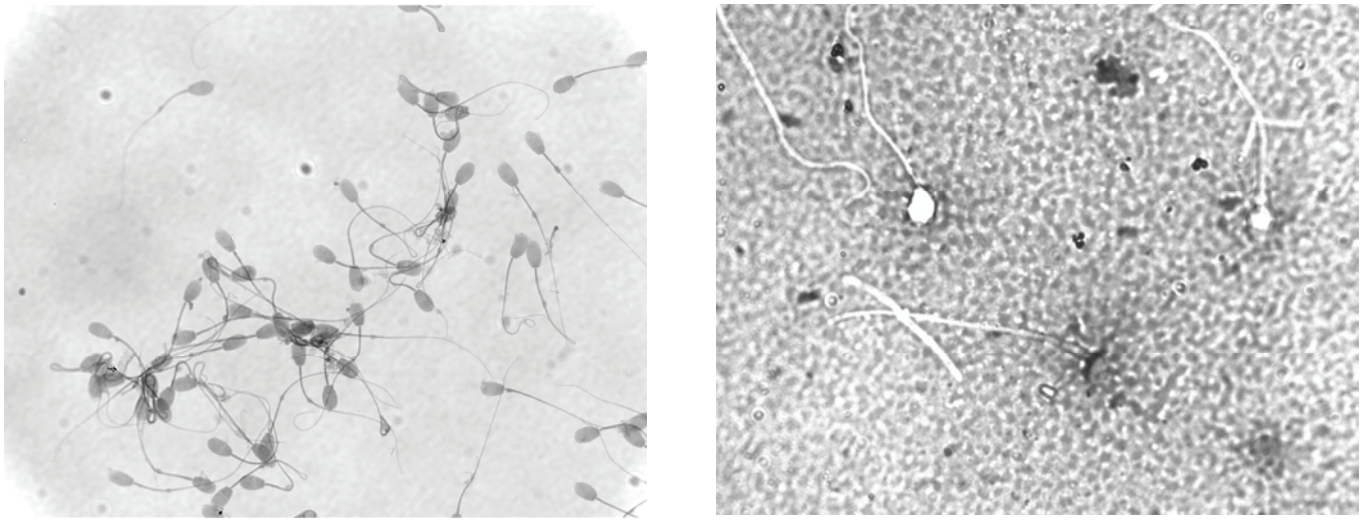
Consiste en la observación del material biológico en estado viviente. El examen inmediato puede realizarse en estado fresco, por tratamiento previo con líquidos adicionales o con colorantes vitales.

Observación en estado fresco

Es el método más simple y de fácil uso, que permite apreciar exactamente la morfología y los movimientos. Tiene el inconveniente de que se deben usar materiales delgados y transparentes, y no permite realizar observaciones prolongadas, además de que muestra pocos detalles de estructura.

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org



A B

Figura 10-15. Espermatozoides. ***A.*** Azul de toluidina. 400 X. ***B.*** Análisis seminal o espermiograma con tinción vital. Sólo se tiñen los espermatozoides muertos. Eosina-nigrosina con contraste diferencial de interferencias tipo Varell. 1 000 X.

A veces se debe emplear líquidos fisiológicos, como solución de Ringer o *buffer* salino de fosfatos (PBS), para mantener vivas las células. Si la observación debe ser prolongada, se deberá emplear la cámara húmeda, que consiste en un portaobjetos grueso con una excavación en el centro sobre la que se invierte un cubreobjetos con una gota de líquido fisiológico en el que se suspendió el material por examinar.

Observación con colorantes vitales

Se utilizan con el objeto de estudiar las estructuras sin producir la muerte ni generar artificios de tinción (falsas estructuras generadas por el agregado del colorante). Un colorante vital se fija sobre los elementos celulares de un ser vivo sin ejercer acción nociva sobre él ni sobre sus células o tejidos; se diferencia de otros colorantes en que no reacciona químicamente con los componentes celulares, sino que se acumula en ciertas porciones de los mismos (figura 10-15). Algunos de los más utilizados son: rojo neutro, azul de metileno, eosina-nigrosina, azul Nilo, azul de cresilo, violeta de cresilo, violeta de metilo y verde Jano. Sus requisitos óptimos son: deben utilizarse en soluciones muy diluidas, ser solubles en agua y poco o nada tóxicos.

Observación con tratamiento previo con líquidos adicionales

Es una técnica intermedia entre el examen mediato y el inmediato, ya que consiste en el uso de líquidos que modifican las propiedades ópticas de las células, como la mezcla de alcohol-agua-glicerina, ácido acético, etc.

Examen mediato

La observación en estado vivo es insuficiente para lograr el conocimiento de la célula, dado que sus partes constituyentes poseen más o menos el mismo índice de refracción.

Para salvar este inconveniente, las células se tiñen a fin de suplir las escasas diferencias de contraste. Para poder colorear una célula es necesario realizar los procedimientos descritos anteriormente en la técnica histológica, desde la fijación.

Habitualmente se usa la técnica de Papanicolaou para tinciones citológicas de rutina.

Esta técnica es muy similar a la de HE, porque los colorantes empleados son a base de hematoxilina y eosina.

TÉCNICAS ESPECIALES DE TINCIÓN (ARGÉNTICAS)

A continuación se muestran algunas de las muchas técnicas especiales de tinción existentes en histopatología, las cuales pueden emplearse con fines de diagnóstico, de docencia y de investigación. Las técnicas argénticas usan sales de metales pesados como la plata, los cuales

www.elsolucionario.org

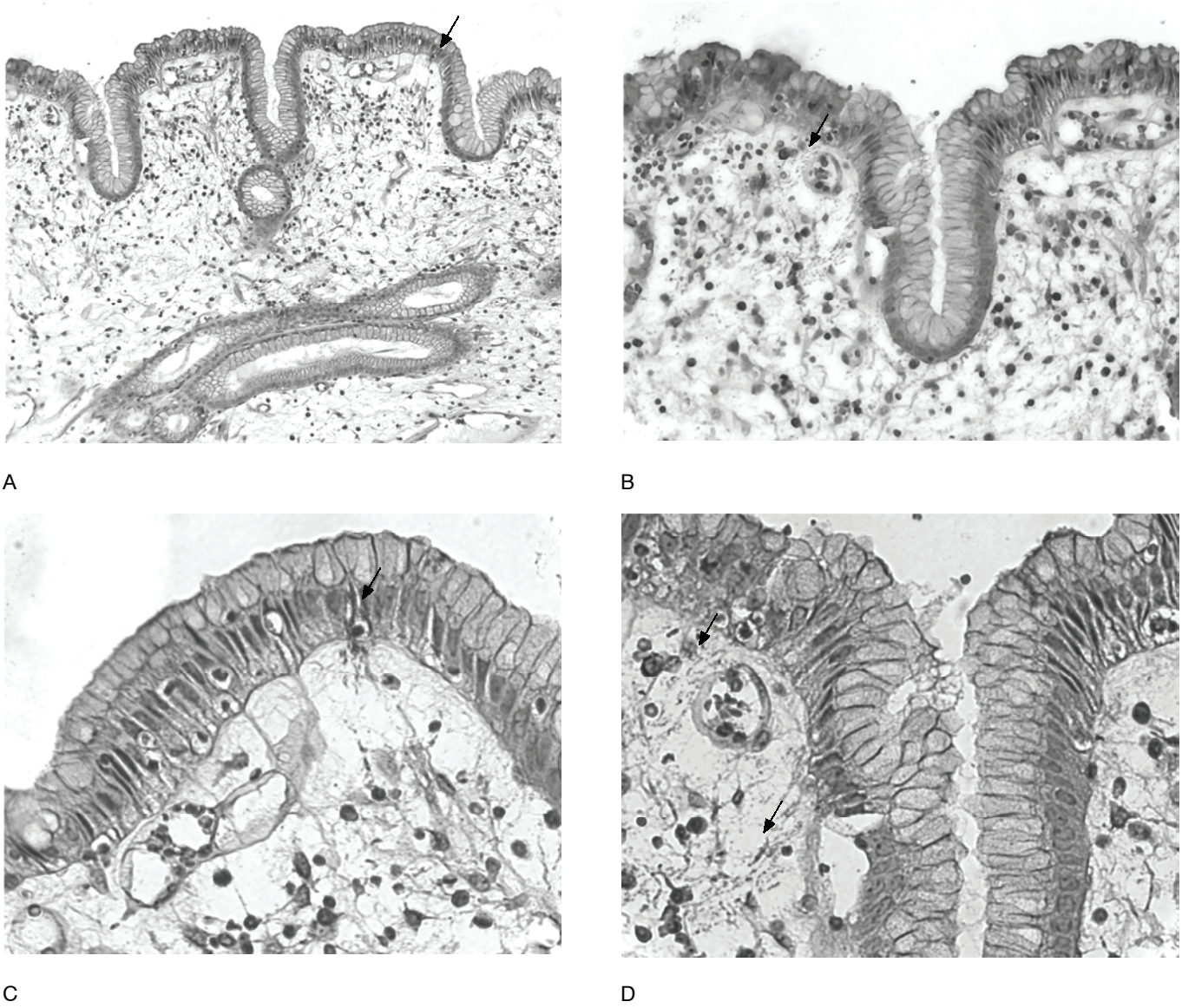


Figura 10-16. Fotografías de células neuroendocrinas aisladas o argentafines ubicadas en la mucosa gástrica. Las flechas muestran los gránulos argénticos de la secreción neuroendocrina. La secreción se difunde a la lámina propia. Tinción argentafín de Grimelius. ***A.*** 100 X. ***B.*** 200 X. ***C*** y ***D.*** 400 X.

se depositan en los tejidos de interés como neuronas, células argentafines, etc., observándose de color oscuro (figuras 10-16 a 10-18).

INMUNOLOCALIZACIÓN PARA PROTEÍNAS

Las técnicas descritas en este capítulo están basadas en tejidos incluidos en parafina; sin embargo, pueden ser aplicadas en tejidos incluidos en frío o en células. En los dos últimos casos, la técnica parte desde el paso de bloqueo de sitios antigénicos, ya que los tejidos no necesitan desparafinarse o rehidratarse.

Inmunohistoquímica con peroxidasa

Después de obtenidos los tejidos previa perfusión por vía intracardiaca e intratraqueal con etanol absoluto u otro fijador en caso de ser animales pequeños de laboratorio, por disección, se extraen los órganos que se fijan por inmersión con el mismo fijador que se usó en la perfusión durante 48 h, y después se incluyen en parafina. Se realizan cortes de 5 μm de espesor que se montan en

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

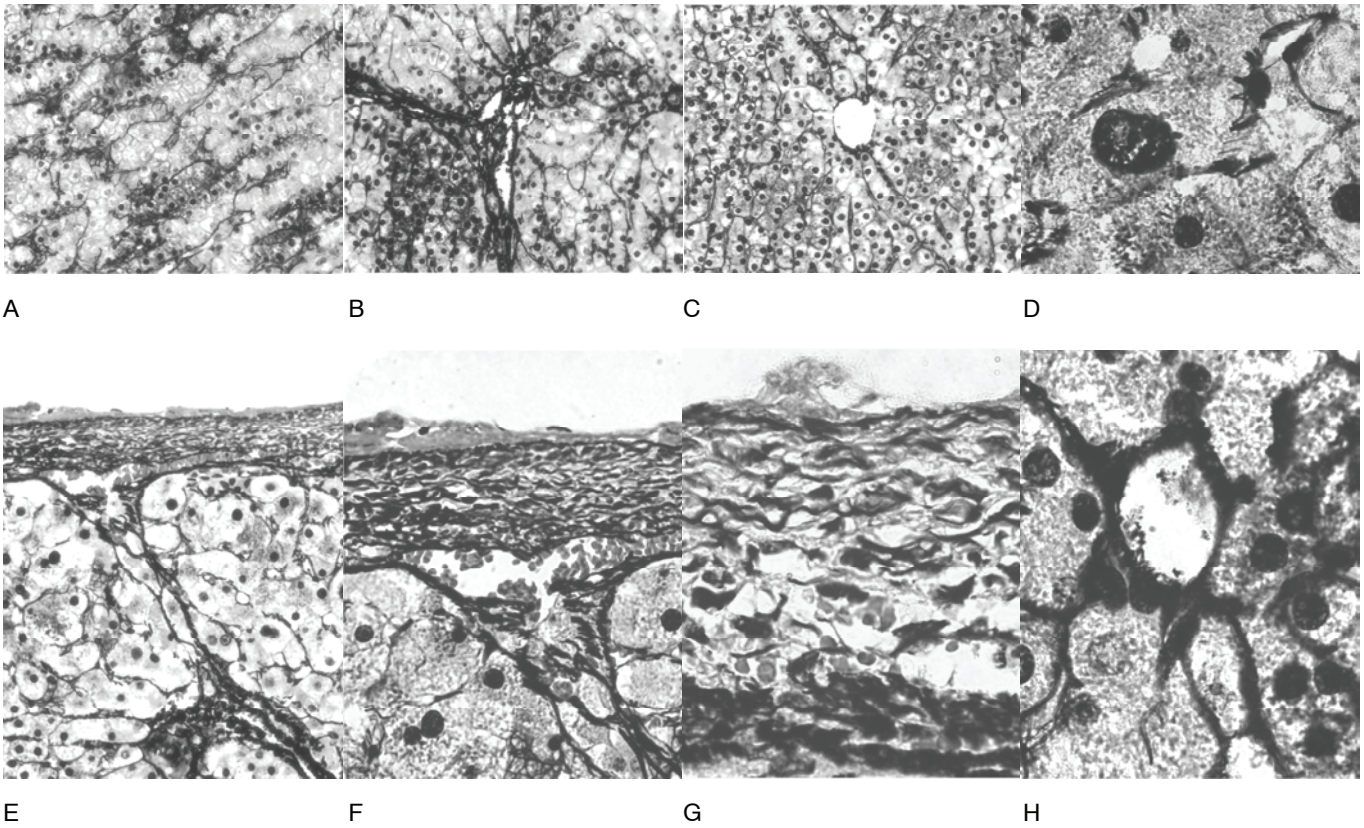


Figura 10-17. Tinción de retículo de Wilder para fibras reticulares. La galería corresponde a diversos cortes y aumentos de tejido hepático. ***A.*** Cordones de hepatocitos. 200 X. ***B.*** Triada portal (arteria, vena y conductillo biliar). 200 X. ***C.*** Vena central. 200 X. ***D.*** Hepatocito. 1 000 X. ***E, F*** y ***G.*** Cápsula de Glisson. 200 X, 400 X y 1 000 X, respectivamente. ***H.*** Vena central, 1 000 X.

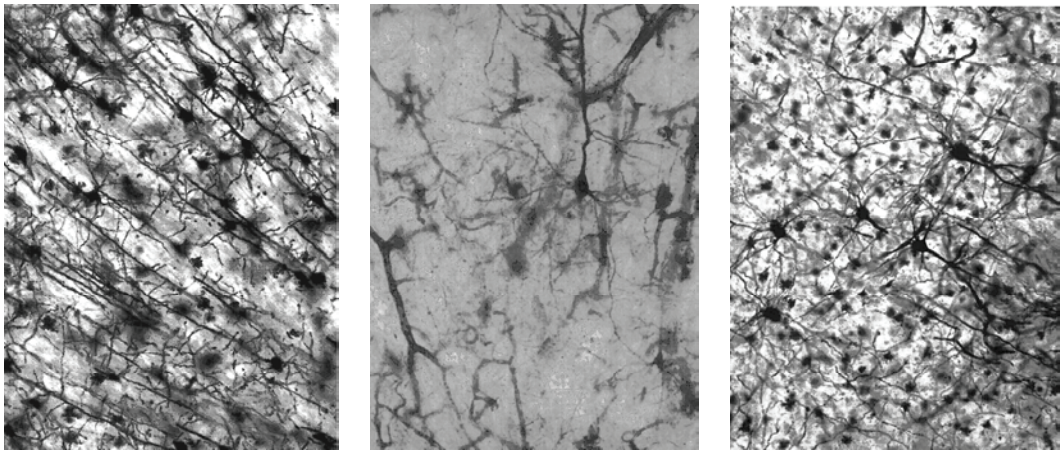
portaobjetos recubiertos con Poli-L-Lisina® (1:10) (Sigma-Aldrich Co., EUA), los cuales se desparafinan y rehidratan con Declere® (Cell Marque, EUA). La peroxidasa endógena se inhibe por incubación con una solución de metanol y peróxido de hidrógeno a 30% (34 mL de metanol y 6 mL de H_2O_2) (Merck, Darmstadt) durante 2 h en un vaso de Coplin. Luego de lavar con alcohol de 96°, agua y *buffer* salino de fosfatos (PBS) se bloquean los sitios libres antigénicos con suero de cabra a 3% (Santa Cruz Biotechnology, EUA) en PBS/Triton® a 0.3% por 30 min.

Posteriormente se decanta el exceso y se aplican los anticuerpos primarios contra los antígenos blanco a una dilución 1:100 en la solución de bloqueo. Se incuba toda la noche en cámara húmeda a 4 °C. Terminado este tiempo, las laminillas se lavan dos veces en agitación de 100 revoluciones por minuto (rpm) con PBS y se agregan los anticuerpos secundarios: antirratón, conejo y cabra biotinilados dirigidos contra los anticuerpos primarios correspondientes (Jackson Immunoresearch, EUA) a una dilución 1:200 en la solución de bloqueo y se dejan incubar por 1 h a temperatura ambiente en agitación de 20 rpm; luego se lava nuevamente dos veces en agitación de 100 rpm con PBS. Las preparaciones se colocan nuevamente 30 min en la cámara húmeda en contacto con el complejo avidina-biotina (Vectastain ABC) a 0.05% del reactivo A, y 0.05% del reactivo B (Vector Laboratories) en PBS. La reacción antígeno anticuerpo se detecta empleando una solución que contiene 40 µL de H_2O_2 a 30% (Merck, Darmstadt), ya que es el sustrato de la enzima peroxidasa, 1 mg del cromógeno diaminobencidina (DAB) (SIGMA, St. Louis, MO, EUA) (que funciona como aceptor de electrones), disuelto en 1 mL de PBS.

Después de 15 min de exposición a esta solución, las laminillas se lavan con agua corriente, se contratiñen con hematoxilina de Harris (figura 10-18), se deshidratan y se montan con resina sintética (Zymed Laboratories, San Francisco, CA, EUA) y cubreobjetos de 25 x 25 mm del número 1 (VWR International, EUA). Posteriormente se observan al microscopio adecuado. Para este ejemplo se utilizó el invertoscopio Axiovert 200 M® (Carl Zeiss). Se toman fotografías digitales con la Axiocam HRC® (Carl Zeiss).

Las imágenes se capturan y analizan mediante el software KS-300® versión 3.0 (Carl Zeiss) (figura 10-19).

www.elsolucionario.org



A B C

Figura 10-18. Fotografía de neuronas de rata teñidas con técnicas argénticas que utilizan sales de metales pesados que se impregnan en las neuronas. ***A.*** Golgi-Cox. ***B.*** Golgi rápido. ***C.*** Golgi-Cox-Nissl. 200 X.

Inmunohistoquímica con fosfatasa alcalina

Después de obtenidas las muestras y fijadas por inmersión por 48 h con el fijador elegido, se incluyen en parafina. Se realizan cortes de 5 μm de espesor que se montan en portaobjetos recubiertos con Poli-L-Lisina® (1:10) (Sigma-Aldrich Co., EUA), los cuales se desparafinan y rehidratan con Declere® (Cell Marque, EUA). Luego de lavar con *buffer* salino de fosfatos (PBS), se bloquean los sitios libres antigénicos con suero de cabra a 3% en PBS/Triton® 0.3% (Santa Cruz Biotechnology, EUA) por 30 min. Posteriormente se decanta el exceso y se aplican los anticuerpos primarios, p. ej., monoclonal IgG_1 de ratón antiantígeno blanco a una dilución 1:100 en la solución de bloqueo. Se incuba toda la noche en cámara húmeda a 4 °C. Terminado este tiempo, las laminillas se lavan dos veces en agitación de 100 rpm con PBS y se agregan 50 μL de anticuerpo secundario cabra antirratón y anticonejo acoplado a fosfatasa alcalina (DakoCytomation EnVision system-AP®, Carpinteria, Cal, EUA) y se deja incubar por 1 h a temperatura ambiente en agitación de 20 rpm; luego se lavan nuevamente dos veces en agitación de 100 rpm con PBS. La reacción antígeno anticuerpo se detecta con 100 μg del cromógeno rojo rápido en naftol solución y Buffer Tris® más levamisol para inhibir fosfatasa alcalina endógena (DakoCytomation EnVision system-AP®, Carpinteria, Cal, EUA). Después de 15 min de exposición a esta solución, las laminillas se lavan con agua corriente, se contratiñen con hematoxilina de Harris y se montan con glicerol o VECTASHIELD® (Vector Laboratories, Burlingame, California, EUA) y cubreobjetos de 25 x 25 mm del número 1 (VWR International, EUA). Después de sellar las preparaciones permanentemente con esmalte de uñas (Revlon), se observan en el invertoscopio Axiovert 200 M® (Carl Zeiss) o con cualquier otro microscopio, se toman fotografías digitales con la Axiocam HRC® (Carl Zeiss) (opcional).

Las imágenes se capturan y analizan mediante el software KS-300® versión 3.0 (Carl Zeiss) (figura 10-20), o con otro software similar.

Inmunofluorescencia

Esta técnica se realiza para observar y analizar preparaciones histológicas o células en microscopios de fluorescencia (epifluorescencia) o microscopios confocales (figura 10-21). Después de perfundir por vía intracardiaca e intratraqueal con el fijador elegido, por disección, se extraen los órganos; las muestras se posfijan por inmersión en el mismo fijador 48 h y después se incluyen en parafina. Se realizan cortes de 3 μm de espesor y se montan en portaobjetos con Poli-L-Lisina® (Sigma-Aldrich) para realizar inmunofluorescencia indirecta, los cuales se desparafinan y rehidratan con Declere®. Luego de lavar con agua y PBS, se bloquean los sitios libres antigénicos para evitar pegado inespecífico con suero de cabra (Santa Cruz Biotechnology) a 3% en PBS/Triton X-100® a 0.1% por 30 min. Posteriormente se decanta el exceso de la solución y se colocan los anticuerpos primarios contra los antígenos blanco a una dilución 1:100 en cámara húmeda, y se dejan incubando toda la noche a temperatura ambiente. Terminado este tiempo, las laminillas se lavan tres veces con PBS y se agregan los anticuerpos secundarios acoplados a fluoro-

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

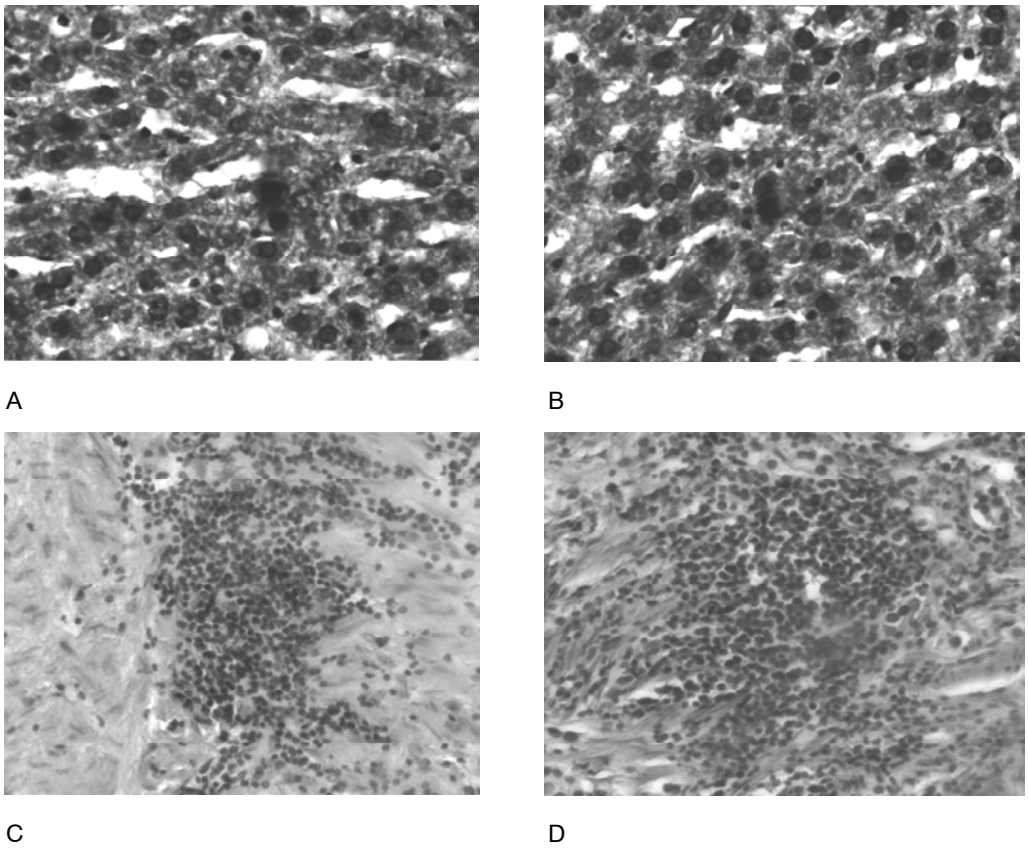


Figura 10-19. Inmunohistoquímica de CD4. Muestra representativa de un experimento donde se compara un grupo expuesto (***A*** y ***B***) contra su control no expuesto (***C*** y ***D***). Las fotografías superiores son fotografías de hígado con técnica de fosfatasa alcalina. La marca de esta enzima está dada por el color rojizo, mientras que en azul es solamente la contratinción de hematoxilina. Las fotografías inferiores son fotografías de MALT con técnica de peroxidasa. La marca de esta enzima está dada por el color café, mientras que en azul es solamente la contratinción de hematoxilina. Las células marcadas en las fotografías superiores corresponden a células de Kupffer (macrófagos hepáticos) que expresan la molécula CD4 en su membrana; en las fotografías inferiores del tejido linfoide asociado a mucosas (MALT) corresponde a linfocitos T cooperadores (Th). En el análisis de imagen densitométrico del grupo control y el expuesto no se observa diferencia estadísticamente significativa. $P > 0.05$.

cromos (FITC, cianina 5 0 Cy5, TRITC, etc.) contra los anticuerpos primarios correspondientes a una dilución 1:100, y se dejan incubar por 50 min en la cámara húmeda oscura; luego se lavan nuevamente tres veces con PBS, y se montan en los cubreobjetos con la resina VECTASHIELD® y se sellan con Rubber Cement®. Posteriormente se observan con el microscopio adecuado. Para este ejemplo se utilizó el microscopio Axiovert 200M® con sistema confocal LSM 5 Pascal® (Carl Zeiss) del Laboratorio de Microscopia Confocal del Departamento de Biología Celular y Tisular de la Escuela Médico Militar (figura 10-21).

Sistema avidina-biotina

La avidina es una glicoproteína derivada del huevo con afinidad extremadamente alta (afinidad constante > 10^{15} M^{-1}) para la biotina. Muchas moléculas de biotina pueden acoplarse a una proteína, permitiendo a la proteína biotinilada unirse a más de una molécula de avidina. Si la biotinilación se realiza en condiciones óptimas, la actividad biológica de la proteína puede conservarse. Por los enlaces covalentes con que se une la avidina con diferentes ligandos, como fluorocromos, enzimas o marcadores, el sistema avidina-biotina puede utilizarse para estudiar una amplia variedad de estructuras biológicas y procesos. Este sistema ha demostrado ser particularmente útil en el descubrimiento y localización de antígenos, glucoconjugados y ácidos nucleicos, empleando anticuerpos biotinilados, lectinas o sondas de ácidos nucleicos. El método "ABC", o método del complejo preformado, es una variante del sistema avidina-biotina. Después de la aplicación de un anticuerpo primario o secundario biotinilado se agrega un complejo preformado entre avidina y una enzima biotinilada. El

www.elsolucionario.org

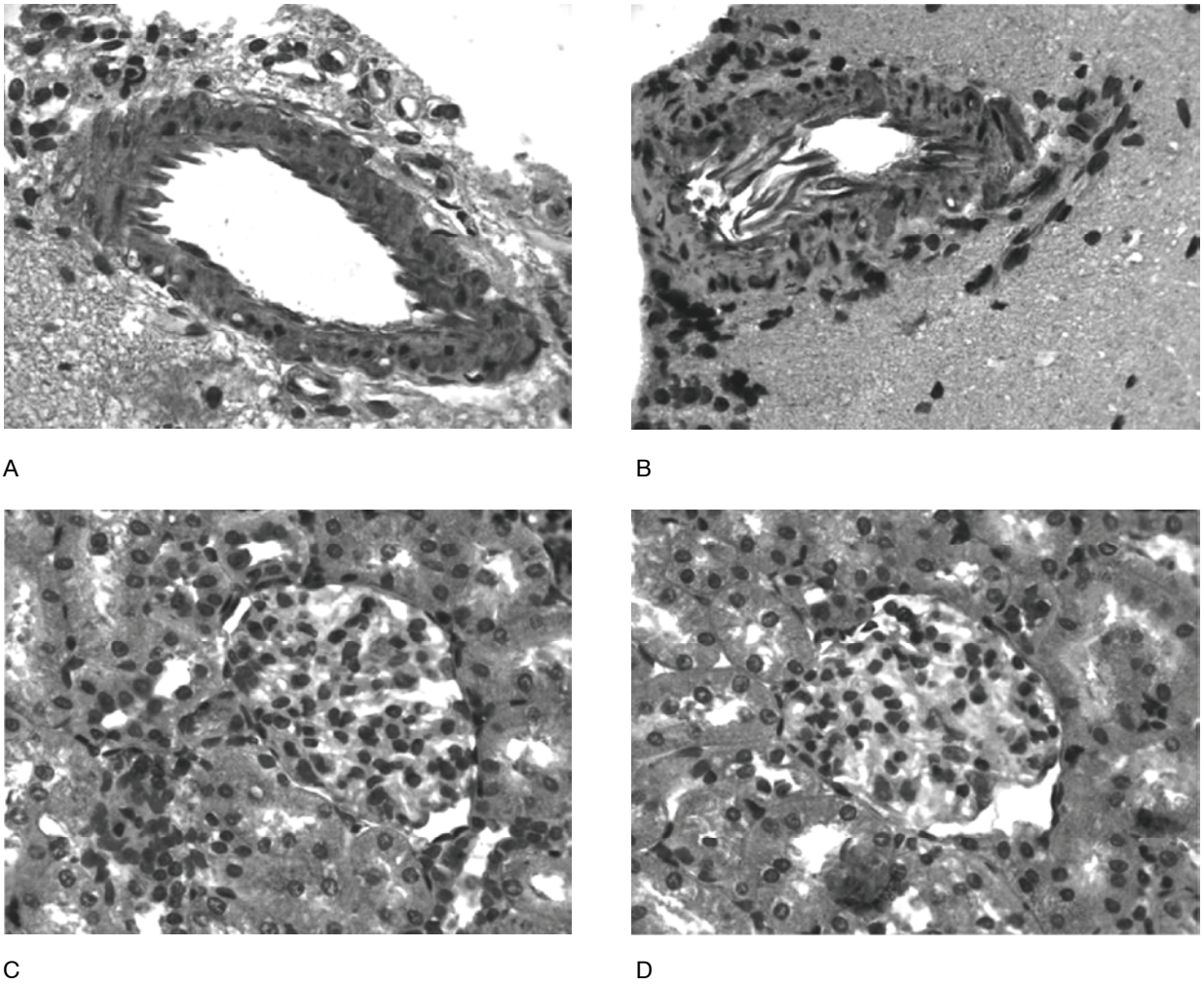


Figura 10-20. Inmunohistoquímica con fosfatasa alcalina de cinasa dependiente de ciclina 1 y 2 (CDC1 y CDC2). Muestra representativa de un experimento donde se compara un grupo expuesto (***A*** y ***B***) contra su control no expuesto (***C*** y ***D***). Cerebro (superior). Riñón (inferior). Por densitometría, no hubo diferencia estadísticamente significativa. P > 0.05.

sistema de avidina-biotina proporciona la sensibilidad más alta en fluorescencia y en la detección basada en enzimas, versatilidad que permite intercambio fácil o introducción de marcadores múltiples, y la habilidad de localizar o descubrir antígenos difíciles de ver o medir con otras técnicas.

DETECCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS POR MICROSCOPIA

Hibridación *in situ* (ISH)

Esta técnica se aplica a la detección de secuencias específicas de ácidos nucleicos, ya sea de RNA o de DNA, a nivel del núcleo o citoplasma. La conjunción entre las técnicas histológicas y el marcaje de sondas de ácidos nucleicos ha permitido identificar las células involucradas en el proceso que se estudia en el contexto de un tejido. Las ventajas del uso de la ISH sobre otras técnicas son muy amplias; por un lado se pueden utilizar tejidos fijados con formaldehído e incluidos en parafina y almacenados durante años, a diferencia de las mayoría de las técnicas que estudian la expresión celular, que utilizan tejido fresco. La ISH es una herramienta muy poderosa para identificar qué células expresan genes específicos (mRNA), para detectar qué tipo de células están infectadas con algún virus, parásito o bacteria patógenos y para estudiar características intrínsecas del genoma, identificación de genes (DNA), sexo o alteraciones cromosómicas. Incluso se pueden evaluar de manera semicuantitativa y cualitativa las características y niveles de expresión de genes en particular.

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

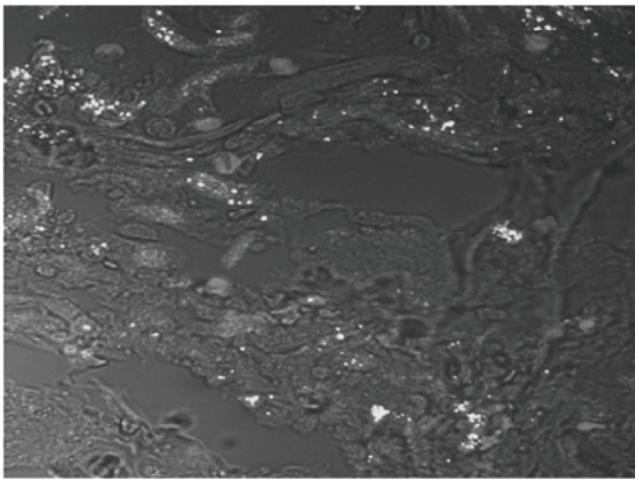


Figura 10-21. Preparación de doble marcaje para melanoma captada con el invertoscopio Axiovert 200M® con sistema confocal LSM5 Pascal®. La fotografía fue tomada en tres canales: contraste diferencial de interferencia tipo Varell, canal verde para fluoresceína acoplada a nm23-H1 (proteína inhibidora de metástasis de ubicación citoplasmática), y el canal rojo para rodamina acoplada a p53 (esta proteína es un regulador transcripcional con actividad supresora de tumores). La marca de p53 es de localización nuclear en células tumorales (se observan células que no expresan p53 en esta preparación y corresponden a células normales). Se observan algunas sombras negativas correspondientes a nucleolos de células positivas. No se observa colocalización de estas proteínas. 1 000 X.

Por un lado se puede tener abundancia de material biológico almacenado por años sin detrimento en la estructura y calidad de los ácidos nucleicos, y por otro se utilizan cantidades minúsculas del tejido (cortes de 3 a 5 μm).

El procedimiento de la ISH involucra una serie de pasos que se pueden resumir de la siguiente forma:

Los cortes histológicos se colocan en laminillas recubiertas con moléculas cargadas que permiten una unión fuerte entre el tejido y la superficie del vidrio, como el silano y la Poli-L-Lisina®. La desparafinación del tejido se logra mediante calentamiento a 60 °C y tratamiento con xilol; posteriormente se realiza la rehidratación en la cual la muestra se sumerge en un "tren" de etanol más agua a concentraciones decrecientes hasta que el tejido queda sumergido completamente en agua destilada. Es importante destacar que después de la desparafinación la muestra fijada se considera tejido fresco y como tal debe ser tratada para evitar la pérdida de la estructura y la degradación de los ácidos nucleicos. El siguiente paso, llamado de permeabilización, se logra al tratar la muestra con la enzima proteinasa K a muy baja concentración (1 a 5 μg/mL) o pepsina; con estas enzimas se digieren estructuras proteicas que estorban el paso de sondas marcadas hacia el citoplasma o el núcleo celular.

Posteriormente se realiza el proceso de prehibridación o bloqueo de sitios que potencialmente pueden generar uniones inespecíficas entre la sonda que va a utilizarse y las secuencias de RNA o DNA existentes en las células. Se utiliza una solución de prehibridación que entre sus componentes utiliza también DNA fraccionado de esperma de salmón. La función de estos fragmentos de DNA desnaturalizado en cadena sencilla es unirse a los sitios inespecíficos para evitar que la sonda se una en secuencias incorrectas.

El siguiente paso es el de hibridación, en la cual una sonda específica se une a una secuencia complementaria, ya sea en el citoplasma o en el núcleo. Con los tratamientos previos a la hibridación se logra que las células del tejido sean permeables a la sonda, que generalmente es una secuencia de DNA de cadena sencilla de 20 a 50 bases. En este paso es crucial calentar la muestra a una temperatura de 80 °C (temperatura de desnaturalización) para permitir la desnaturalización de estructuras secundarias de RNA y que la sonda se una a la secuencia complementaria. Este paso se continúa a una temperatura de 37 a 45 °C durante 24 horas para permitir que la sonda sature los sitios de unión en el citoplasma celular.

Al finalizar el paso anterior se deben eliminar el exceso de sonda y algunas uniones inespecíficas, para lo cual se realizan lavados hipertónicos que eliminan la sonda no incorporada. Los lavados se realizan a una astringencia tal que elimina el exceso de sonda y las uniones falsas entre la sonda y secuencias inespecíficas.

Finalmente, la preparación se monta (montaje de la preparación); si se utilizó una sonda marcada con moléculas fluorescentes, se coloca sobre la muestra una sustancia que conserva la fluorescencia, como VECTASHIELD®. Se cubre la preparación con un cubreobjetos y se sella con esmalte para uñas transparente. El procedimiento que se acaba de describir se denomina ISH directa, ya que la sonda utilizada emite por sí misma la señal fluorescente. Pero si la sonda contiene estreptavidina, se puede usar un anticuerpo secundario biotinado con su respectivo paso de revelado con diaminobencidina (DAB) para utilizar microscopia de luz, ya que la DAB tiene un color café tabaco característico. En este caso la técnica se denomina ISH indirecta, ya que utiliza un sistema de revelado adicional que reacciona con la sonda.

Cuando se evalúa la expresión de genes, se debe considerar que en el ambiente, en la piel del experimentador, en el aire exhalado y prácticamente en todas las superficies existen RNAsas que pueden degradar los

www.elsolucionario.org

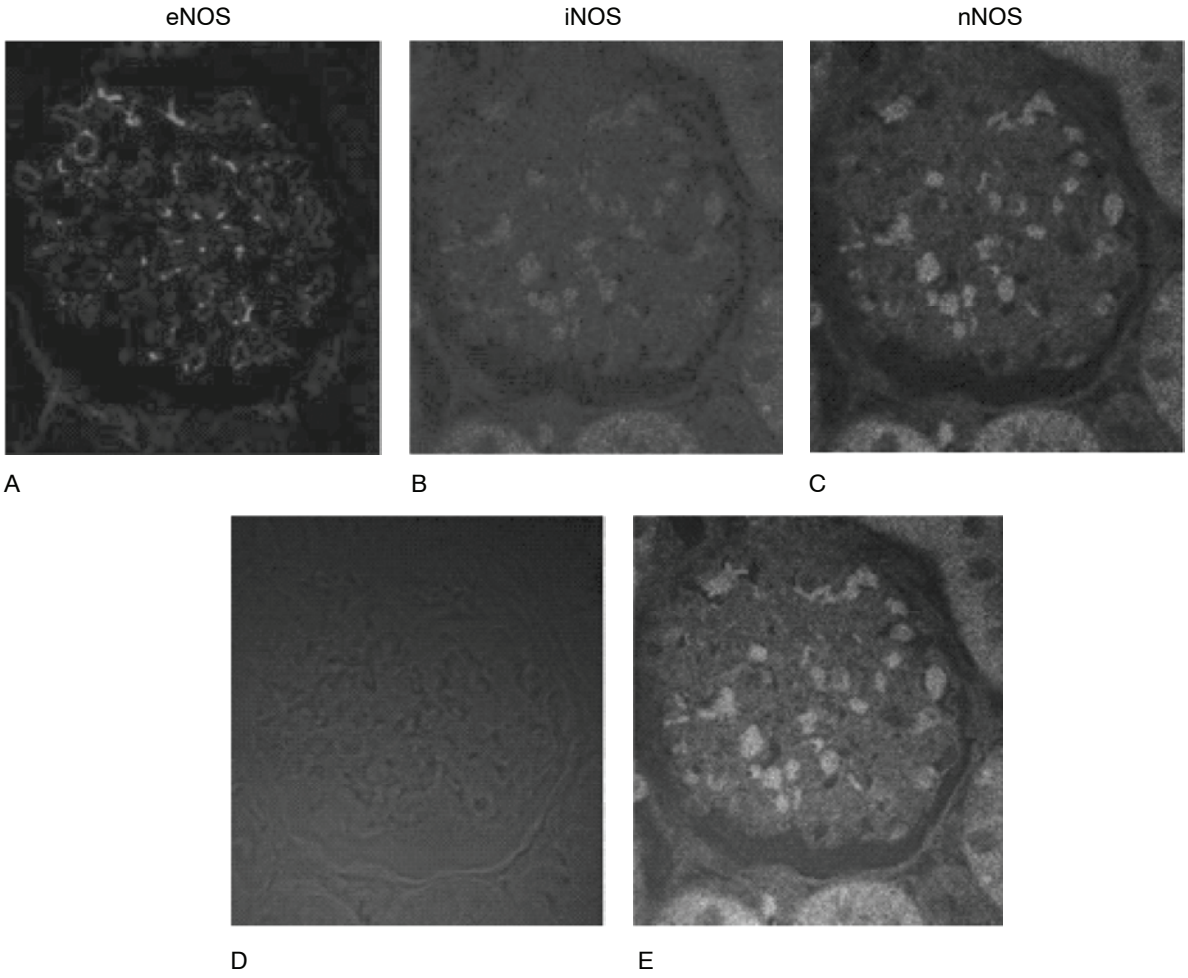


Figura 10-22. Expresión del mRNA de las NOSs por FISH. Las fotografías corresponden al glomérulo renal. El mRNA de la nNOS fue detectado por la sonda acoplada a fluoresceína (verde), el mRNA de la iNOS fue detectado por la sonda acoplada a rodamina (rojo), y el mRNA de la eNOS fue detectado por la sonda acoplada a Cy5 (azul). Los mRNA fueron detectados en canales independientes; en un cuarto canal (esquina inferior izquierda) se utilizó el contraste diferencial de interferencia tipo Varell. ***E*** corresponde a la colocalización de los cuatro canales antes mencionados.

mRNA del tejido que se va a analizar; por lo tanto, todo el material de laboratorio que se utiliza para esta técnica debe descontaminarse con el fin de eliminar las RNAsas. Para tal efecto, se hornea a 300 °C por cuatro horas todo el material de metal y de vidrio, el agua que se utiliza se trata con dietilpirocarbonato (DEPC), que elimina la actividad de las RNAsas, y se debe trabajar en condiciones adecuadas de biología molecular utilizando campana de flujo laminar, mechero de Bunsen, gafas, bata, cubrebocas y guantes.

Hibridación *in situ* fluorescente (FISH)

Para la descripción de esta técnica se utiliza como ejemplo un experimento realizado para analizar y cuantificar la expresión de los mRNA de las sintasas de óxido nítrico neuronal (nNOS), inducible (iNOS) y endotelial (eNOS) (figura 10-22).

Sondas de hibridación

Se sintetizaron tres sondas para hibridación, las cuales contienen fluorocromos en el extremo 5' (MWG Biotech, Ebersberg). Las 20 bases antisentido para nNOS son: (3'-AAGTTGTCGCAGAGGAGGAT-fluoresceína-5'), las cuales son complementarias de las posiciones 2736-2775 del mRNA de rata con número de acceso del GenBank® de NM_052799. Las veinte bases antisentido para iNOS son: (3'-TCAAACTGGTCTCCTGGGTC-Rojo Texas-5'), las cuales son complementarias de las posiciones 546-565 del mRNA de rata con número de acceso del GenBank® de NM_012611.

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

Cuadro 10-1. Sondas de hibridación

RNA	Secuencia GenBank®	Posiciones		Oligonucleótidos usados en este estudio
nNOS	NM_052799	2736-2775	Antisentido	3'-AAGTTGTCGCAGAGGAGGAT-fluoresceína-5'
			Sentido	5'-fluoresceína-TTCAACAGCGTCTCCTCCTA-3'
iNOS	NM_012611	546-565	Antisentido	3'-TCAAACTGGTCTCCTGGGTC-Rojo Texas-5'
			Sentido	5'-Rojo Texas-AGTTTGACCAGAGGACCCAG-3'
eNOS	NM_021838	1393-1413	Antisentido	3'-TACCAGTTGATAAAGGACAGG-Cy5-5'
			Sentido	5'-Cy5-ATGGTCAACTATTTCCTGTCC-3'

Secuencia de oligonucleótidos usados en la triple hibridación *in situ* fluorescente (FISH) RNA, posiciones en el mRNA, fluorocromos acoplados y sus secuencias correspondientes en el GenBank®.

Las 21 bases antisentido para eNOS son: (3'-TAC-CAGTTGATAAAGGACAGG-Cy5-5'), las cuales son complementarias a las posiciones 1393-1413 del mRNA de rata con número de acceso del Gen-Bank® de NM_021838 (cuadro 10-1). Las sondas fueron resuspendidas en agua con dietilpirocarbonato (DEPC) a una concentración final de 1 μg/mL y almacenadas a -20 °C en oscuridad. Inmediatamente antes de la hibridación, las sondas se diluyeron a una concentración de 500 ng/mL en agua DEPC.

Triple hibridación *in situ* fluorescente RNA (FISH RNA)

La FISH RNA se realizó en cortes de tejido de 5 μm de espesor que se montaron en portaobjetos recubiertos con Poli-L-Lisina (1:10) (Sigma-Aldrich Co., EUA), los cuales fueron desparafinados y rehidratados con Declere® (Cell Marque, EUA) en condiciones libres de RNAasas. Los cortes fueron pretratados secuencialmente con citrato de sodio SSC-DEPC 2 X por 10 min, proteinasa K (1 μg/mL por 10 min) y paraformaldehído 1% en PBS-DEPC por 10 min a 4 °C. Posteriormente se prehibridaron durante 1 h en 50 μL de *buffer* de hibridación a 40 °C; este *buffer* contiene: 50% v/v formamida, SSC 5X (SSC 1x es 0.15 M cloruro de sodio y 0.015 M de citrato de sodio), dextran sulfato 10%, 10 mg/mL de esperma de salmón desnaturalizado, solución de Denhardt 1X y DTT 0.1 M en agua DEPC. Para la FISH se aplicaron 30 μL de la mezcla de hibridación (500 ng de cada sonda en *buffer* de hibridación) y se cubrieron con cubreobjetos de 24 x 50 mm. Las preparaciones fueron colocadas en un termociclador de gradiente con termoblock para FISH Px2 (Hybaid, Franklin, MA), se desnaturalizaron a 80 °C por 5 min, y se incubaron a 37 °C por 24 h. De forma paralela, se hibridaron sondas sentido como control de FISH inespecífica. Después de la hibridación, las preparaciones fueron lavadas tres veces en SSC 2X y dos veces en SSC 0.2 x 30 min, cada lavado respectivamente a 37 °C. Después se les aplicaron 50 μL de la resina hidrosoluble de montaje VECTASHIELD®. Finalmente, las preparaciones fueron selladas permanentemente con esmalte de uñas (Revlon) y se escanearon con un microscopio confocal LSM-5 Pascal® acoplado a un microscopio Axiovert 200 M® equipado con objetivos de inmersión plan-neofluar 40 X con apertura numérica de 1.3 (Carl Zeiss, Jena). Para la sonda de nNOS acoplada a fuoresceína con excitación a 488 nm se utiliza un láser de argón de 30 mW; para la sonda de iNOS acoplada a rojo Texas con excitación a 543 nm se utiliza un láser de helio-neón 1 de 1 mW, y para la sonda de eNOS acoplada a Cy5 con excitación a 633 nm se utiliza un láser de helio-neón 2 de 5 mW. La señal fluorescente de nNOS se observa usando un filtro dicroico (HFT 488/543/633) y un filtro de emisión (BP505-530). La señal fluorescente de iNOS se observa usando un filtro dicroico (HFT 488/543/633) y un filtro de emisión (LP560). La señal fluorescente de eNOS se observa usando un filtro dicroico (HFT 488/543/633) y un filtro de emisión (LP650). Una computadora Pentium IV equipada con el programa LSM5 Pascal versión 3.2 se utiliza para operar el sistema. La detección de ganancia y haz del láser *(pinhole)* se ajusta de manera automática. La resolución de las imágenes es de 1 024 x 1 024 pixeles (8 bits, 256 niveles de color). Los experimentos se realizan por triplicado de manera independiente (figura 10-22).

TÉCNICAS DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA (ME)

Fijadores más apropiados para microscopia electrónica

El tamaño de la muestra por fijar debe ser de 1 a 2 mm, dependiendo del estudio para el cual se vaya a utilizar y del fijador utilizado.

www.elsolucionario.org

1. **Tetróxido de osmio (OsO_4) o ácido ósmico.** Es el fijador clásico de ME, porque protege las lipoproteínas naturales de los tejidos. Es muy irritante y se debe evitar respirar sus vapores. El frasco debe ser de color oscuro, y hay que extremar su limpieza, primero con éter y luego con agua. Refuerza el contraste para la observación al ME.
2. **Permanganato de potasio (MnO_4K).** No es un fijador de uso general. Preserva eficazmente las lipoproteínas de sistemas membranosos, pero destruye casi todo lo que no sea lipoproteína. La temperatura de fijación debe ser 0 °C. Es específico para retículo endoplasmático (RE), poros nucleares, membranas y vesículas sinápticas.
3. **Formaldehído o formol (H-CHO).** De manera pura es gaseoso. A 40% se llama formalina o formol, y se obtiene por oxidación del alcohol metílico. Produce extracción de grasas, pero conserva bien las proteínas. No se recomienda usarlo solo, porque se desintegran los cortes por el bombardeo de electrones.
4. **Glutaraldehído ($OHC-CH_2-CH_2-CHO$).** Es el mejor para preservar la morfología celular porque no se pierde la actividad enzimática, y preserva las lábiles estructuras intracelulares mejor que el OsO_4. La fijación más perfecta es usando los dos técnicas, es decir, la doble fijación o mixta.
5. **Paraformaldehído.** Su presentación es en polvo, y se debe preparar justo antes de su uso. Se agrega lentamente sobre el *buffer* elegido (de fosfatos o de cacodilatos), estando éstos a 60 °C, ya que es poco soluble (figura 10-23) y necesita calor para mezclarse.
6. **Aldehído acrílico o acroleína.** Tiene la ventaja de su gran rapidez de penetración en el tejido, evitando la contracción de éste, pero no retiene las gotas de lípidos y destruye las enzimas.
7. **Frío.**
   - **a.** Se pueden estudiar diversos estadios de las funciones celulares, ya que la fijación es instantánea.
   - **b.** No se produce retracción del tejido.
   - **c.** Homogeneidad en todo el espesor de los fragmentos por fijar, porque se suprime la onda de penetración de los fijadores químicos.
   - **d.** No se altera la composición química del tejido.
   - **e.** No se producen extracciones de sustancias solubles.
   - **f.** Si se producen pequeños cristales de hielo, se pueden disolver con etanol o acetona a baja temperatura (de -20 a -60 °C), como se hace en el método de congelación-sustitución, o también se puede usar el método de congelación-desecación.

Figura 10-23. Preparación del paraformaldehído. Se debe preparar justo antes de su uso. Laboratorio de Fisiología de la Facultad de Medicina de la UNAM.

Condiciones básicas de la fijación ultraestructural

Los tejidos deben ser frescos o de animales recién sacrificados, aunque se prefiere *in vivo* bajo el efecto de la anestesia o en estado agónico, para que no se suprima la circulación sanguínea. La fijación será más perfecta cuanto más pequeño sea el fragmento; éste debe quedar de menos de 1 mm^3. Mientras dure la acción del fijador se debe mantener a una temperatura de 0 a 4 °C, para frenar al máximo la actividad autolítica. El tiempo promedio de fijación debe ser de entre 1 y 4 h; se debe mantener a un pH de entre 7.2 y 7.4 (lo más cercano al pH fisiológico); esto se logra usando amortiguadores o *buffers*. La presión osmótica debe ser constante alrededor de 0.34 M.

Los iones favorecen la fijación de determinadas estructuras. El ion amonio es el principal responsable de la destrucción de las membranas del RE. Los iones Mg^{++} y Ca^{++} previenen la extracción de sustancias cementantes. El Ca^{++} es de gran importancia para la integridad del núcleo.

Después de pasado el tiempo de fijación se debe lavar perfectamente el tejido.

Preparación de tejidos para microscopia electrónica

- **Fijación:** en glutaraldehído a 2.5% en *buffer* de fosfatos al 0.2M con pH de 7.2 a7.4 durante 2 h a 4 °C.

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

Figura 10-24. Deshidratación de las muestras de 1 mm³ para microscopia electrónica. Laboratorio de Patología Experimental del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán".

- **Lavado:** en PBS al 0.15M con pH de 7.4 a 4 °C. Hacer tres cambios de 15 min.
- **Osmicación** (posfijación o doble fijación): tetróxido de osmio a 1% en PBS al 0.3M durante 2 h.
- **Lavado:** en PBS al 0.15M con pH de 7.4 a 4 °C.
- Hacer tres cambios de 15 min.
- **Deshidratación:**
  - Acetona 50% por 5 min.
  - Acetona 70% por 10 min.
  - Acetona 80% por 10 min.
  - Acetona 96% dos cambios de 15 min.
  - Acetona 100% tres cambios de 15 min. También se puede utilizar acetona para la deshidratación. Al término de este paso se pueden almacenar los tejidos (figura 10-24).
- **Infiltración:** acetona-resina en relación 1:1 tres cambios de 1 h cada uno.
- **Inclusión:** epon (resina) absoluta en estufa de polimerización a 60 °C en cápsulas de grenetina hasta que polimerice (aproximadamente 36 h) (figura 10-25). Como la resina se conserva a 4 °C, antes de realizar la inclusión debe estar a temperatura ambiente, para lo cual es necesario sacarla 2 h antes (tiempo aproximado) del refrigerador.
- **Tallado de la pirámide:** cuando la cápsula de resina haya polimerizado, se rebaja el exceso con la navaja para formar una pirámide que asemeje la punta de un lápiz, tanto en la forma como en el procedimiento de sacarle punta con navaja (figura 10-26).
- **Cortes semifinos:** se realizan cortes semifinos de 0.45 μm de espesor, se montan en portaobjetos y se tiñen con azul de toluidina-borato de sodio 1:1 para seleccionar el área de interés. El azul de toluidina se debe filtrar con Millipore® 0.4 para eliminar los grumos. Se aplican gotas del colorante sobre el portaobjetos, éste se coloca en la plancha caliente y cuando adquiere el halo dorado se lava con alcohol absoluto para que vire de morado a azul; se seca y se vuelve a lavar con agua bidestilada. Antes del montaje se sumerge en tolueno puro, para evitar la decoloración prematura.
- **Cortes finos:** se lavan las rejillas con dextrán o acetona para eliminar grasas. Se obtienen cortes finos de 50 a 100 nm de espesor (color oro pálido), y se montan en rejillas de níquel recubiertas de oro sin membrana de fombar, ya que ésta es muy adhesiva y capta polvo, formando artificios (figura 10-27). Se captan de tres a cuatro cortes por rejilla. Se dejan secar por 15 min para que los cortes no se desprendan.
- **Preparación de la cámara de contraste:** en una caja de Petri grande se colocan lentejas de NaOH,

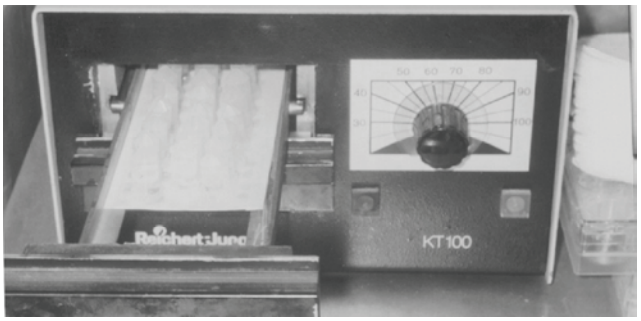


Figura 10-25. Se muestran las cápsulas de grenetina que contienen el tejido incluido en la resina Epon® en la estufa de polimerización. La resina polimeriza a 60 °C.

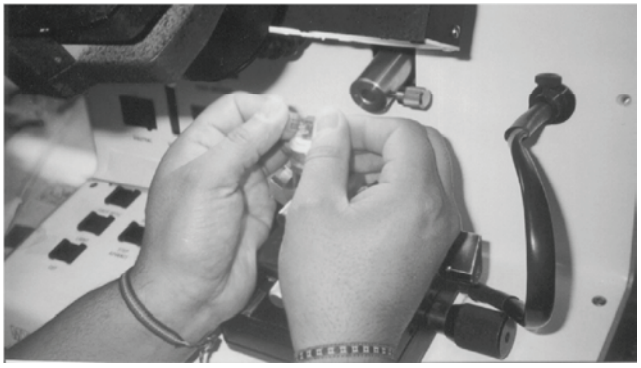
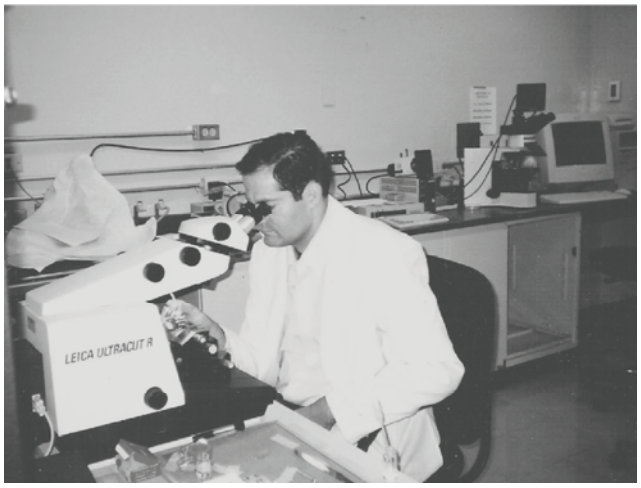
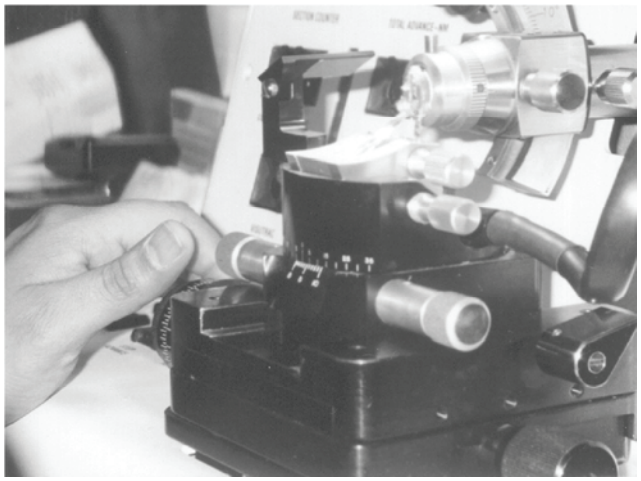


Figura 10-26. Se muestra el procedimiento de tallado de la pirámide. La cápsula de resina se fija en el ultramicrotomo y se procede al tallado con una navaja.

www.elsolucionario.org



A



B

Figura 10-27. ***A.*** Obtención de cortes en el ultramicrotomo. ***B.*** Detalle de la cápsula de resina montada en el ultramicrotomo armado con cuchilla de vidrio. Laboratorio de Microscopia Electrónica del Instituto de Neurociencias de la UNAM-UAQ, en Juriquilla, Querétaro, México.

con el fin de obtener una cámara con atmósfera libre de carbonatos. Se coloca en la base un trozo de Parafilm® y sobre él se colocan las gotitas de acetato de uranilo (una gota por rejilla) por 15 a 20 min (primer contraste). Se puede centrifugar cada uno de los reactivos a 1 000 rpm por 10 min para eliminar grumos.

- **Lavado:** en vasos de precipitados de 50 mL, hacer pasadas rápidas con agua desionizada hervida. Cada vaso admite cuatro rejillas; después se deberá cambiar el agua.
- **Secado:** por toque en papel filtro, obviamente del lado contrario del tejido, empezando con la punta de la pinza; se dejan secar durante 10 min.
- **Segundo contraste:** colocar Parafilm® limpio para el citrato de plomo, se aplica una gota por rejilla. Después se pasan las gotas de NaOH al 0.02 N para detener la reacción.
- **Lavado:** en vasos de precipitados de 50 mL, hacer 16 pasadas rápidas con agua desionizada hervida; es decir, se colocan cuatro vasos consecutivos y se pasan por lavadas rápidas en cada uno de los vasos. Cada vaso admite cuatro rejillas, y después se deberá cambiar el agua.
- **Secado:** las rejillas se dejan secar en papel filtro.
- **Observación al microscopio electrónico de transmisión.** Los MET que se encuentran en la Escuela Médico Militar, en el departamento de Patología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán" y en la Facultad de Medicina de la UNAM, son del modelo Carl Zeiss EM-10® (figura 9-4).

Inmunoelectromicroscopia

Después del corte fino en ultramicrotomo se bloquean los sitios libres antigénicos, para evitar pegado inespecífico con suero de un animal distinto del de la fuente del anticuerpo, durante1 h.

Posteriormente se aplican los anticuerpos mediante la siguiente secuencia:

1. **Anticuerpo primario:** se incuban con el anticuerpo primario toda la noche a 4 °C con diluciones de 1:20-40-80-100 y 150 en PBS-ovalbúmina, para estandarizar la técnica.
2. **Secado:** se dejan secar por media hora, ya que al haber estado en incubación toda la noche, el tejido queda muy reblandecido y se podría desprender de la rejilla en los siguientes lavados.
3. **Lavado:** por flotación con PBS-Tween® por 15 min, y después un lavado por flotación con PBS-ovalbúmina-Tween® por 10 min.
4. **Anticuerpo secundario:** se incuba con el anticuerpo secundario contra el animal de que está purificado el anticuerpo primario acoplado a oro 1:20 en PBS-ovalbúmina por 1 h (figura 10-28).
5. **Lavado:** por flotación con PBS-Tween® por 15 min.
6. **Lavado** por flotación con agua bidestilada.
7. **Secado:** las rejillas se dejan secar por media hora.
8. **Contraste:** se contrasta con acetato de uranilo por 30 seg. Es recomendable guardar el acetato de uranilo en una jeringa con filtro Millipore®

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

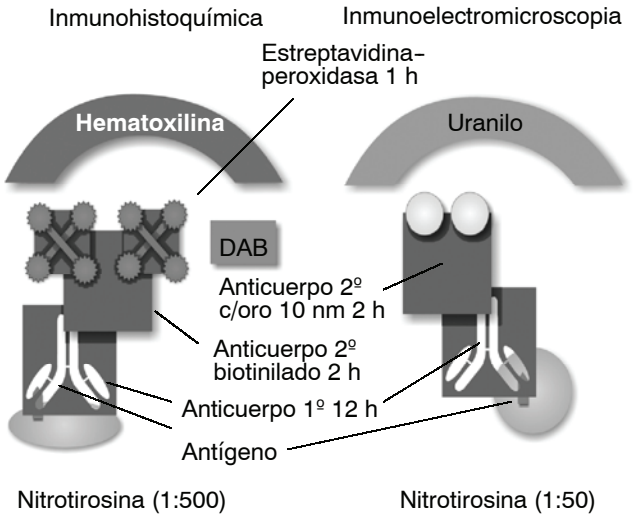


Figura 10-28. Esquema general de la técnica de inmunolocalización por microscopia. A la izquierda se observa el procedimiento de la inmunohistoquímica indirecta para microscopia de luz. A la derecha se observa el procedimiento para realizar la inmunoelectromicroscopia. En esta técnica, el anticuerpo secundario está acoplado a partículas de oro que se ven como puntos diminutos en las micrografías.

del más fino para aplicación, ya que retiene los precipitados; además, debe estar recubierta de papel de aluminio, para evitar que se desnaturalice.

9. **Lavado:** las rejillas se decantan y se realiza un último lavado con agua bidestilada para quitar el exceso de uranilo.
10. **Secado:** las rejillas se dejan secar.
11. **Observación al microscopio electrónico:** para este ejemplo se utilizó el microscopio electrónico de transmisión JEOL (figura 10-29).

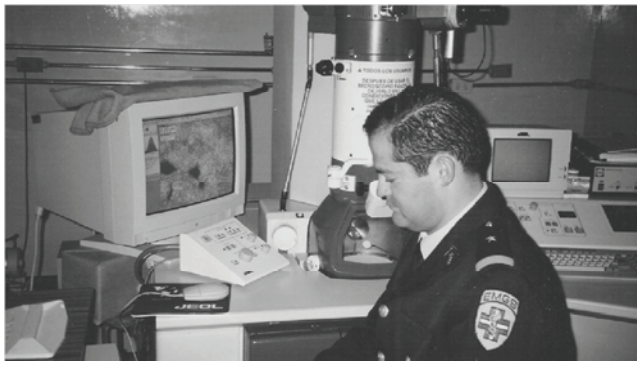


Figura 10-29. Observación al microscopio electrónico. El autor en el laboratorio de microscopia electrónica del Instituto de Neurociencias de la UNAM–UAQ, en Juriquilla, Querétaro, México. Este MET es de la marca JEOL e incluye computadora y software para análisis de imagen.

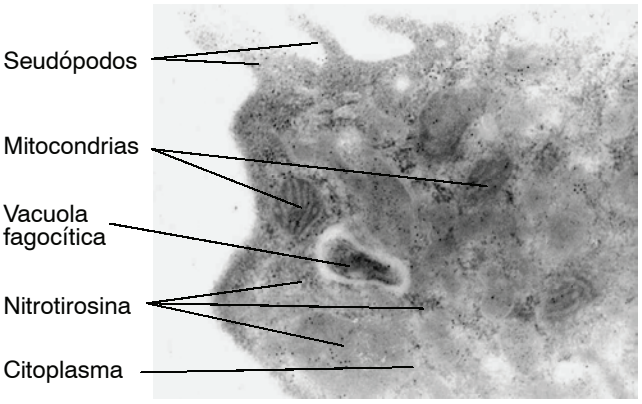


Figura 10-30. Fotografía de un macrófago alveolar activado. Se observa una vacuola fagocítica que contiene en su interior una bacteria. Inmunoelectromicroscopia para nitrotirosina. 25 000 X.

Nota: la técnica de inmunoelectromicroscopia no utiliza la doble fijación con tetróxido de osmio, ya que éste también contrasta los tejidos, es decir, los oscurece, y al aumentar los tonos de grises enmascara las partículas negras de oro correspondientes a la marca del anticuerpo de interés en el estudio.

Por esta misma razón, tampoco se utiliza el doble contraste con citrato de plomo, y únicamente se usa el acetato de uranilo. Al final, los cortes quedan con un buen fondo pálido especial para que contrasten las partículas de oro (figura 10-30).

En esta técnica, la resina LR White® de grado medio que se utiliza es hidrosoluble, a diferencia del Epon®, que no lo es. Esta propiedad de hidrosolubilidad es la que permite que los anticuerpos penetren el tejido incluido y se unan con sus epítopes respectivos (figura 10-30). Si los tejidos fueron incluidos en Epon® sin osmio, los cortes se pueden desplastificar con agua oxigenada a 10% en agua bidestilada durante 10 min, antes de incubar con el anticuerpo primario. De esta manera se resuelve el problema de la hidrosolubilidad.

FRACCIONAMIENTO CELULAR

Introducción al fraccionamiento subcelular

El fraccionamiento subcelular es un conjunto de métodos y técnicas que tienen como objetivo obtener fracciones puras o enriquecidas en un determinado componente celular, ya sea éste un organelo (mitocondrias,

www.elsolucionario.org

vesículas, ribosomas, etc.), una fracción de membrana (membrana total, plasmática, dominio basolateral, dominio apical, etc.), complejos multiproteicos (citoesqueleto de actina, microtúbulos, poros nucleares, etc.) y macromoléculas por ultracentrifugación. El proceso de fraccionamiento subcelular tiene dos etapas:

1. **Ruptura** de las células o tejidos para obtener un lisado celular (o tisular) en el que la fracción de interés se encuentre en condiciones adecuadas para su purificación.
2. **Separación** de la fracción deseada del resto de los componentes de la célula o del tejido mediante algún criterio, como puede ser la diferencia de densidad (centrifugación en gradientes o centrifugación diferencial), presencia de algún antígeno (inmunoprecipitación, cromatografía de inmunoafinidad, etc.).

Posteriormente, la mezcla del homogenado se somete a centrifugación por rotación en una ultracentrífuga. En un primer paso, a una velocidad relativamente baja, sedimentarán células enteras, núcleos, restos de membranas y componentes del citoesqueleto. Sometiendo a mayor velocidad al sobrenadante, se obtiene un *pellet* o sedimento con la fracción que contiene mitocondrias, lisosomas y peroxisomas. A una velocidad alta, y con más tiempo de centrifugación, se separa la fracción que contiene las vesículas membranosas del retículo endoplasmático, llamadas microsomas, y otras vesículas pequeñas. Finalmente, a muy alta velocidad y después de largo tiempo de centrifugación, se obtienen ribosomas y grandes macromoléculas, quedando un sobrenadante que contiene otras biomoléculas, como proteínas solubles.

La obtención de estas estructuras aisladas tiene por objeto estudios bioquímicos relacionados con ellas, como, p. ej., estudiar la respiración celular, alguna vía metabólica que ocurra en la fracción microsomal, etc. La centrifugación diferencial permite obtener un fraccionamiento inicial del contenido celular, que luego puede purificarse con más precisión mediante una centrifugación isopícnica o en gradiente de densidad. En este método se coloca en un tubo de ultracentrífuga una sustancia, como percol, sacarosa o cloruro de cesio, en un gradiente de densidad, preparado con un aparato especial de mezclado (un formador de gradientes), de forma que la densidad aumente desde la superficie hasta el fondo. Cuando se coloca una mezcla de componentes celulares sobre este gradiente de densidad y se centrifuga a alta velocidad, los distintos tipos de componentes se separan en distintas bandas en las regiones del gradiente con igual densidad, medidas en unidades S (Svedverg).

Centrifugación

Ya que se obtiene el lisado u homogenado celular, se debe fraccionar por centrifugación. Este procedimiento consiste en hacer girar el tubo con la muestra a gran velocidad, de forma que en su fondo se produzca la acumulación de las partículas que tienden a hundirse por tener una densidad menor que la del medio en que se encuentran. Esto permite separar los diversos componentes celulares mediante centrifugación diferencial; de acuerdo con sus tamaños y densidades, sedimentarán a diferentes velocidades. Como se describió anteriormente, cuanto mayor sea el número de revoluciones por minuto, mayor será la fuerza centrífuga ejercida. Después de la centrifugación, la muestra, homogénea, se habrá separado en dos fracciones: el sobrenadante o fracción homogénea que no ha sedimentado, y el sedimento o *pellet* adherido al fondo del tubo.

Técnicas de ruptura de células y tejidos

El primer paso en la técnica es la ruptura de tejidos o células para obtener un lisado celular en el que la proteína, el complejo multiproteico o la estructura subcelular se encuentren en condiciones que permitan su aislamiento. En este procedimiento, las células de una población purificada deben disgregarse en forma cuidadosa y controlada mediante choque osmótico controlado o ultrasonido, haciéndolas pasar a través de un pequeño orificio o lisándolas por homogeneización. Estos tratamientos rompen las membranas, pero dejan intactos los núcleos y la mayoría de los organelos, liberándolos del contenido celular. Los procedimientos de homogeneización más comunes son:

1. **Empleo de homogeneizadores.** Son dispositivos rotatorios con aspas que rompen las células. La cuchilla se ajusta perfectamente a las gruesas paredes de un tubo de cristal especial, el homogeneizador. Existen dispositivos de homogeneización en los que está calibrada la separación entre el émbolo y la pared de cristal, para producir homogeneizados de un tamaño determinado de partícula.
2. **Sonicación.** Es la aplicación de ultrasonido a una suspensión celular. La intensa agitación producida destruye las membranas celulares. Dependiendo de la frecuencia, intensidad y energía aplicadas se pueden destruir también las estructuras subcelulares, e incluso solubilizar complejos proteicos. Generalmente se aplica en frío,

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

para evitar el sobrecalentamiento de las muestras que podría provocar la desnaturalización de las proteínas.

3. **Empleo de detergentes.** Solubilizan las membranas celulares.
4. **Empleo de canales estrechos.** Con este método se pasan las células a través de orificios de diámetros reducidos que producen la ruptura de las membranas celulares.

Tipos de centrífugas

Las centrífugas son aparatos que permiten someter las muestras a intensas fuerzas centrífugas y centrípetas que producen la sedimentación, en poco tiempo, de las partículas de densidad mayor que la del medio que las rodea. En función de los márgenes de aceleración a que someten a las muestras, estos equipos se diferencian en:

1. **Centrífugas pequeñas o picofugas.** Estas centrífugas tienen rangos de velocidad del rotor desde pocas G hasta 3 000 G.
2. **Supercentrífugas.** También son conocidas como centrífugas de alta velocidad, con rango de 2 000 a 20 000 G.
3. **Ultramicrocentrífugas.** Con rango de velocidad de 15 000 a 600 000 G.

En las supercentrífugas y ultracentrífugas se puede controlar la temperatura de la cámara, para evitar sobrecalentamiento de las muestras debido a la fricción. En las ultracentrífugas, la velocidad que supera las 100 000 rpm hace que sea necesario un intenso vacío en la cámara de la centrífuga, para evitar el calentamiento del rotor y de la muestra por la fricción con el aire (figura 10-31).

AUTORRADIOGRAFÍA Y RADIOISÓTOPOS

Los radioisótopos se utilizan para marcar moléculas en las células y los organismos, y de este modo seguir el curso de casi todos los procesos celulares.

Este procedimiento consiste en añadir a las células un precursor marcado con un radioisótopo. Las moléculas radiactivas se mezclarán con las moléculas preexistentes no marcadas, y ambos tipos de moléculas serán tratados de forma idéntica por la célula, ya que sólo se diferencian en el peso de su núcleo atómico.

Algunos de los radioisótopos más usados en biología son: ^{3}H (tritio), ^{14}C (carbono 14), ^{32}P (fósforo 32), ^{35}S (azufre 35) y ^{125}I (yodo 125). Los cambios de la localización o de la forma química de las moléculas radiactivas se pueden seguir en función del tiempo transcurrido

A B C

Figura 10-31. Fotografías de los diversos tipos de centrífugas que existen. ***A.*** Centrífuga pequeña o picofuga de pocas G hasta 3 000 G. ***B.*** Supercentrífuga o centrífuga de alta velocidad hasta 15 000 G. ***C.*** Ultramicrocentrífuga con velocidades de hasta 200 000 G. Estos equipos se encuentran en el Laboratorio de Biología Celular y Tisular de la Escuela Médico Militar, Universidad del Ejército y Fuerza Aérea (UDEFA), México.

www.elsolucionario.org

desde la incorporación del isótopo radiactivo al material, al tejido o al organismo (figura 10–32).

Una de las aplicaciones más importantes de la radiactividad a la biología celular consiste en la localización por autorradiografía de compuestos radiactivos en células vivas o en cortes de tejidos.

En esta técnica, las células vivas se exponen brevemente a un pulso de un compuesto radiactivo determinado y se incuban durante un periodo variable de tiempo, para permitir que el compuesto se incorpore, antes de fijarlas y tratarlas para microscopia óptica o electrónica.

Cada preparación se recubre de una fina película de una emulsión fotográfica y se coloca en la oscuridad varios días, durante los cuales parte del radioisótopo se desintegra e impresiona la emulsión. Entonces la emulsión se revela, y se determina la posición de la radiactividad en cada célula mediante la posición de los granos de plata generados. En el caso de la timidina tritiada (timidina ^3H), un precursor radiactivo del DNA que reemplaza al nucleótido timidina normal por el que contiene ^3H, muestra que el DNA se sintetiza en el núcleo y permanece allí. En cambio, el marcaje de las células con uridina ^3H, un precursor radiactivo del RNA, revela que este ácido nucleico se sintetiza de forma inicial en el núcleo, pero que luego se desplaza rápidamente hacia el citoplasma.

Las moléculas marcadas con radioisótopos también se pueden detectar por autorradiografía después de haber sido separadas de otras moléculas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida o de agarosa; de esta manera se detecta por lo general la posición tanto de las proteínas (geles de poliacrilamida) como de los ácidos nucleicos (geles de agarosa).

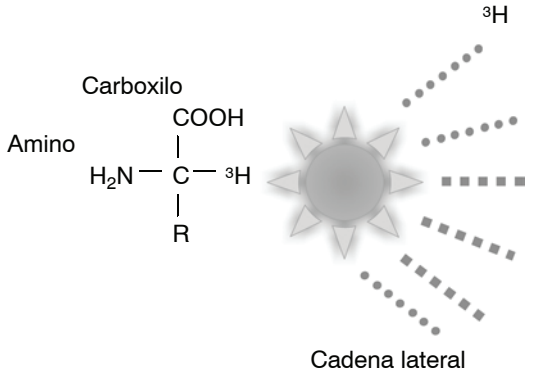


Figura 10–32. Esquema de la irradiación de la molécula de tritio ^3H (isótopo del hidrógeno). Las moléculas radiactivas se mezclan con las moléculas preexistentes no marcadas, y la señal emitida puede ser captada mediante autorradiografía.

Cuando se emplean moléculas de DNA o RNA marcadas con radiactividad como sondas para buscar moléculas de ácidos nucleicos complementarias a ellas, se usa la autorradiografía para detectar la posición y la cantidad de estas moléculas que se hibridan con la sonda, ya en una membrana de nylon o sobre el corte de un tejido, como en el caso de la hibridación *in situ* con nucléotidos acoplados a radioisótopos.

AISLAMIENTO Y CRECIMIENTO DE CÉLULAS EN CULTIVO

Introducción

Los procedimientos bioquímicos requieren gran cantidad de células que se tienen que lisar. Si la muestra proviene de un tejido, tiene el inconveniente de que se mezclarán entre sí fragmentos de todas sus células y se originará una gran confusión. Para evitar estas imprecisiones, se desarrollaron en biología celular técnicas de disociación de células a partir de los tejidos, y de separación de los distintos tipos celulares. Estos procedimientos permiten, además, que las células aisladas proliferen en cultivo.

Aislamiento y separación de células

El primer paso del aislamiento de células a partir de tejidos consiste en romper la matriz extracelular y las uniones intercelulares que mantienen unidas entre sí a las células. Los mejores resultados se obtienen con células disociadas de tejidos fetales o neonatales, típicamente tratándolos con enzimas proteolíticas (como la tripsina y la colagenasa) y con agentes como el Ca^{++}, del que depende la adhesión celular. Los tejidos se disocian mediante agitación suave. Las células vegetales tienen una zona donde se desarrolla la división celular, que está restringida a ciertas zonas o meristemas. Asimismo, las paredes vegetales se tienen que degradar previamente con enzimas específicas, como pectinasas, ya que están unidas entre sí por una sustancia cementante de naturaleza polisacárida denominada lámina media o péctica.

Para separar los diferentes tipos celulares a partir de una suspensión celular mixta se utilizan varios métodos que aprovechan las diferentes propiedades físicas de las células. Por ejemplo, las células grandes pueden separarse de las pequeñas, y las células más densas de las menos densas, mediante centrifugación. Otra estrategia

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

se basa en la tendencia de algunos tipos celulares a adherirse fuertemente al cristal o al plástico, lo cual permite separarlas de células que se adhieran menos. La técnica más sofisticada de separación celular se basa en el marcaje específico de las células con anticuerpos acoplados a un colorante fluorescente, y posterior separación de las células marcadas de las no marcadas mediante un clasificador celular activado por fluorescencia. Este procedimiento se lleva a cabo en un citómetro de flujo en donde las células pasan en fila a través de un haz láser, determinándose la fluorescencia de cada célula *(sorting)*.

Una vez que se han separado las células, se pueden utilizar directamente para realizar diversos análisis, aunque generalmente se aprovecha esta población celular viva para empezar un cultivo, permitiendo estudiar el complejo comportamiento de estirpes celulares en placas de cultivo.

Cultivo celular en placas de cultivo

La mayoría de tipos celulares tanto vegetales como animales sobreviven, se multiplican e incluso expresan propiedades diferenciales en una placa de cultivo en condiciones adecuadas. Las células pueden visualizarse al microscopio o analizarse bioquímicamente, y también se pueden estudiar los efectos de la adición o eliminación de moléculas determinadas, como hormonas o factores de crecimiento. Además, en cultivos mixtos pueden estudiarse las interacciones entre un tipo celular y otro. Los experimentos con células en cultivo se denominan *in vitro* (en vidrio), a diferencia de los experimentos realizados en organismos intactos o *in vivo* (en el organismo vivo).

Los experimentos originales implicaban el cultivo de pequeños fragmentos de tejido, denominados explantes o explantos. Si bien esta técnica sigue utilizándose, especialmente en cultivos de tejidos vegetales, en la actualidad los cultivos se preparan por lo general a partir de suspensiones de células obtenidas por disociación de tejidos, como se ha descrito antes. A diferencia de las bacterias y de muchas células vegetales, la mayor parte de las células animales no están adaptadas para crecer en suspensión, de forma que necesitan una superficie sólida sobre la cual poder crecer y dividirse. Actualmente, este soporte lo constituye la superficie de plástico de una placa de cultivo. Sin embargo, los distintos tipos celulares tienen requerimientos diferentes, de forma que algunos de ellos no crecen, o no se diferencian, a menos que la placa de cultivo esté recubierta de componentes de matriz extracelular, como el colágeno.

Los cultivos preparados directamente a partir de los tejidos de un organismo, con fraccionamiento previo o sin él, reciben el nombre de cultivos primarios. En la mayoría de los casos, las células de los cultivos primarios pueden recuperarse de la placa de cultivo y utilizarse para formar un gran número de cultivos secundarios. De esta forma, las células pueden ser subcultivadas repetidamente durante semanas o meses. Estas células muestran *in vitro* las propiedades que las caracterizan *in vivo:* los fibroblastos continúan secretando colágeno, las células derivadas del músculo esquelético embrionario se fusionan formando fibras musculares gigantes que se contraen de forma espontánea en la placa de cultivo, las células nerviosas emiten axones que son excitables eléctricamente y que establecen sinapsis con otras células nerviosas, y las células epiteliales forman extensas láminas con muchas de las propiedades del epitelio del que proceden.

Líneas celulares eucariotas

La mayoría de las células de los vertebrados mueren tras un número finito de divisiones en cultivo: p. ej., las células cutáneas humanas en cultivo sobreviven durante algunos meses, dividiéndose únicamente entre 50 y 100 veces antes de morir. Esta vida limitada está relacionada con la vida limitada del animal del que derivan las células. Sin embargo, en cultivo ocasionalmente surgen algunas células que han sufrido alguna mutación que las hace inmortales. Estas células proliferan indefinidamente y pueden propagarse como una línea celular.

Las líneas celulares obtenidas a partir de células cancerosas difieren de las que se obtienen a partir de células normales en varios aspectos; p. ej., a menudo las líneas de células cancerosas crecen sin fijarse a ninguna superficie, y proliferan en una placa de cultivo en densidad mucho mayor que la de las células normales.

A pesar de que todas las células de una línea celular son muy similares entre sí, a menudo no son idénticas. La uniformidad genética de una línea celular puede mejorarse con la clonación celular, mediante la cual se aísla una única célula y se le permite proliferar hasta formar una colonia. Un clon es cualquier población de células derivadas de una única célula ancestral. Una de las aplicaciones más importantes del clonaje celular ha sido el aislamiento de líneas celulares mutantes con defectos en determinados genes. A menudo, el estudio de las células que son defectuosas en una proteína determinada revela muchos datos sobre la función que tiene esta proteína en las células normales.

www.elsolucionario.org

Referencias

1. **Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K *et al.:*** *Biología molecular de la célula.* 3ª ed. España, Omega, 1996.
2. **Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raff M *et al.:*** *Essential cell biology (an introduction to the molecular biology of the cell).* New York, Garland, 1998.
3. **Ameisen JC:** Programmed cell death and AIDS: from hypothesis to experiment. *Immunol Today* 1992;13:388.
4. **Ashwell JD, Berger NA, Cidlowski JA, Jane DP, Korsweyer SJ:** Coming to terms with death: apoptosis in cancer and immune development. *Today* 1994;15:147-151.
5. **Baynes JW, Dominiczak MH:** *Bioquímica médica.* 2ª ed. España, Elsevier-Mosby, 2006.
6. **Begunov BN, Zakarnov NP:** *Teoría de sistemas ópticos.* Moscú, MIR, 1976:172-229, 264-391.
7. **Bernis MJ, Aldape BF:** *Atlas de microscopia.* 2ª ed. México, Yukon I-A, 1975.
8. **Binder C, Marx D, Overhoff R, Binder L, Schauer A *et al.:*** Bcl-2 protein expression in breast cancer in relation to established prognostic factors and other clinicopathogenical variables. *Ann Oncol* 1995;6:1005-1010.
9. **Boise LH, González García M, Postema CE:** Bcl-X and Bcl-2 related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 1993;74:597-608.
10. **Boise LH, Gottschalk AR, Quintns J, Thompson CB:** Bcl-2 and Bcl-2-related proteins in apoptosis regulation. *Curr Top Microbiol Immunol* 1995;200:107-121.
11. **Boise LH, Winn AJ, Thompson CB:** Receptors that regulate T-cell susceptibility to apoptotic cell death. *Ann N Y Acad Sci* 1995;766:70-80.
12. **Cascino I, Papoff G, De Maria R, Testi R, Ruberti G:** Fas/Apo-1(CD95) receptor lacking the intracytoplasmatic signaling domain protects tumor cells from Fas-mediated apoptosis. *J Immunol* 1994;156:13-17.
13. **Clement MV, Stamenkovic I:** Fas and tumor necrosis factor receptor-mediated cell death: similarities and distinctions. *J Exp Med* 1994;180:557-567.
14. **Cohen JJ:** Apoptosis. *Immunol Today* 1993;14:126-130.
15. **Cooper GM:** *La célula.* 2ª ed. España, Marbán, 2002.
16. **Corona Perezgrovas M, López Rivera G, Sánchez González DJ:** *Distribución y estado de maduración de células dendríticas y su relación con linfocitos CD4+ en cáncer de próstata.* Boletín cultural. Muestra representativa de trabajos de tesis e investigaciones 2004. Dirección General de Educación Militar y Rectoría de la Universidad del Ejército y Fuerza Aérea, 2004.
17. **Cory S:** Regulation of lymphocyte survived by the Bcl-2 gene family. *Ann Rev Immunol* 1995;13:513-543.
18. **Curtis E, Barnes N:** *Biología.* España, Panamericana, 2000.
19. **De Robertis, De Robertis:** *Biología celular y molecular.* 11ª ed. México, El Ateneo, 1986.
20. **De Vita VT Jr, Hellman S, Rosemberg SA:** *Cancer. Principles & practice of oncology.* 6ª ed. EUA, Lippincott Williams & Wilkins, 2001.
21. **Ellis RE, Yuan J, Horvitz HR:** Mechanisms and functions of cell death. *Ann Rev Cell Biol* 1991;7:663.
22. **Engelman JA, Zhang XL, Galbiati F, Lisanti MP:** Chromosomal localization, genomic organization, and developmental expression of the murine caveolin gene family (Cav-1, -2, and -3): Cav-1 and Cav-2 genes map to a known tumor suppressor locus (6-A2/7q31). *FEBS Lett* 1998;429: 330-336.
23. **Piña JE:** *Bioquímica de Laguna.* 5ª ed. México, El Manual Moderno, 2002.
24. **Eugene H:** *Óptica.* 3ª ed. España, Adisson Wesley Iberoamericana, 2000.
25. **Fawcett DW:** *Tratado de histología.* 12ª ed. Madrid, McGraw-Hill/Interamericana, 1995.
26. **Floriano-Sánchez E, Villanueva C, Medina-Campos ON, Rocha D, Sánchez-González DJ:** Nordihydroguaiaretic acid is a potent *in vitro* scavenger of peroxynitrite, singlet oxygen, hydroxyl radical, superoxide anion, and hypochlorous acid and prevents in vivo ozone-induced tyrosine nitration in lungs. *Free Radical Research* 2006;40:523-533.
27. **Gartner LP, Hiatt JL:** *Histología.* 3ª ed. México, Panamericana, 2003.
28. **Geneser F:** *Histología sobre bases biomoleculares.* 3ª ed. México, Panamericana, 2000.
29. **Green DR:** Apoptotic pathways: ten minutes to dead. *Cell* 2005;121:671-674.
30. **Guyton AC, Hall JE:** *Tratado de fisiología humana.* 10ª ed. México, McGraw-Hill Interamericana, 2001.

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

31. **Harrison:** *Principios de medicina interna.* 14ª ed. México, McGraw-Hill Interamericana, 1998.
32. **Itoh N, Yonehara S, Ishii A:** The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* 1991;6:233-243.
33. **Jiménez LF, Merchant H:** *Biología celular y molecular.* México, Prentice Hall, 2003.
34. **Jondal M, Xue Y, McConkey DJ, Okret S:** Thymocyte apoptosis by glucocorticoids and cAMP. *Curr Top Microbiol Immunol* 1995;200:67-79.
35. **Junqueira LC, Carneiro J:** *Histología básica. Texto y atlas.* 6ª ed. México, Masson, 2005.
36. **Kagi D, Vignaux F, Ledermann B, Depraetere V:** Fas and perforina pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. *Science* 1994;265:528-530.
37. **Karp G:** *Biología celular y molecular.* México, McGraw-Hill, 1998.
38. **Korsmeyer SI:** Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulator of cell death. *Blood* 1992;80:879.
39. **Kroemer G, Martin SJ:** Caspase-independent cell death. *Nat Med* 2005;7:725-730.
40. **Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM:** *Principios de bioquímica.* 2ª ed. Barcelona, Omega, 1993.
41. **Lewin S:** *Genes VIII.* 8ª ed. EUA, Pearson & Prentice Hall, 2004.
42. **Lodish H, Berk A, Zipursky SL *et al.:*** *Biología celular y molecular.* 4ª. ed. España, Médica Panamericana, 2002.
43. **Martin SJ:** Apoptosis: suicide, execution or murder? *Trends Cell Biol* 1993;3:141-144.
44. **McKee T, McKee JR:** *Bioquímica. La base molecular de la vida.* 3ª ed. España, McGraw-Hill-Interamericana, 2003.
45. **Meyn RE, Stephens LC, Mason KA, Medina D:** Radiation-induced apoptosis in normal and premoplastic mammary glands *in vivo*: significance of gland differentiation and p53 status. *Int J Cancer* 1996;66:466-472.
46. **Mirkovich MN, Makarenko WN:** *Sistemas ópticos avanzados y principios ópticos cuánticos.* 1ª ed. Moscú, 1967.
47. **Munn DH, Pressey J, Beall AC, Hudes R, Alderson MR:** Selective activation induced apoptosis of peripheral T cells imposed by macrophages. *J Immunol* 1995;156:515-522.
48. **Núñez G, Clarke MF:** The Bcl-2 family of proteins: regulators of cell death and survival. *Trends Cell Biol* 1994;4:399-403.
49. **Núñez G, Merino R, Grillot D, González García M:** Bcl-2 and Bcl-x regulatory switches for lymphoid death and survival. *Immunol Today* 1994;15:582-588.
50. **Nussbaum RL, Mclnnes RR, Williard HF:** *Thompson & Thompson genética en medicina.* 5ª ed. España, Masson, 2004.
51. **Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ:** Bcl-2 heterodimerizes *in vivo* with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993;74:609-619.
52. **Onishi Y, Kizaki H:** Apoptosis and diseases. *Hum Cell* 1994;7:27-32.
53. **Ordóñez RM, Espinosa AM, Sánchez González DJ, Armendáriz Borunda J, Berumen J:** Enhanced oncogenicity of Asian-American human papillomavirus 16 is associated with impaired E2 repression of E6/E7 oncogene transcription. *J Gen Virol* 2004;85:1433-1444.
54. **Osborne BA, Schwartz LM:** Essential gens that regulate apoptosis. *Trends Cell Biol* 1994;4:394-399.
55. **Osborne B:** Apoptosis and maintenance of homeostasis in the immune system. *Curr Opinion Immunol* 1996;8:245-254.
56. **Owen Schaub LB, Angelo LS, Radinsky R, Ware CF:** Soluble Fas/Apo-1 in tumor cell: a potential regulator of apoptosis? *Cancer Letters* 1995;94:1-4.
57. **Paniagua R *et al.:*** *Biología celular.* 2ª ed. España, McGraw-Hill Interamericana, 2003.
58. **Raff MC:** Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 1992;356:397.
59. **Reap EA, Felix NJ, Wolthusen PA, Kotzin BL, Cohen PL *et al.:*** Bel-2 transgenic Lpr mice show profound enhancement of lymphadenopathy. *J Immunol* 1995; 155:5455-5462.
60. **Ricklets R:** *Invitación a la ecología. La economía de la naturaleza.* 4ª ed. España, Médica Panamericana, 1998.
61. **Ross MH, Romrell LJ, Kaye GI:** *Histología. Texto y atlas color con biología celular y molecular.* 4ª ed. México, Panamericana, 2005.
62. **Sambrook J, Russell DW:** *Molecular cloning. A laboratory manual.* 3ª ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
63. **Sánchez González D J, Villanueva López GC, Sosa Luna CA, Orjuela Henry DJ, Ortega Rangel JA *et al.:*** Óxido nítrico en el sistema nervioso central. Neuronas nitrérgicas. *Neurol Neurocir Psiquiat* 2004;37:73-78.
64. **Sánchez González DJ, Hernández Pando R, Fernández Guzmán MP, Valdez-Espinosa RA, Martínez Martínez CM *et al.:*** Producción de iNOS y nitración de proteínas en la aorta de ratas expuestas a ozono. *Rev Sanid Milit Mex* 2005;59:223-240.
65. **Sánchez González DJ, Moro MA, Castillo Henkel C, Herrera González N, Hernández-Pando R *et al.:*** Ozone exposure induces iNOS expression and tyrosine nitration in rat aorta. *Environ Toxicol Pharmacol* 2004;17:1-7.
66. **Schwartz RH:** *Immunological tolerance. Fundamental immunology.* 3ª ed. New York, Raven Press, 1993.
67. **Silvestri F, Ribatti D, Nico B, Silvestri N *et al.:*** Apoptosis or programmata cell death: regulatory and pathophysiological mechanisms (editorial). *Ann Ital Med Int* 1995; 10:7-13.
68. **Smith SW, McLauglin KA, Osborne BA:** Molecular events in thymocyte apoptosis. *Curr Top Microbiol Immunol* 1995; 200:147-162.
69. **Sobbota H:** *Histología, atlas en color de anatomía microscópica.* 3ª ed. México, Salvat, 1988.
70. **Solomon EP, Berg LR, Martin DW:** *Biología.* 5ª ed. McGraw-Hill/Interamericana, 1999.
71. **Sosa Luna CA, Astudillo de la Vega H, Sánchez González DJ, Martínez Salas SG, Valdez-Espinosa R *et al.:*** Óxido nítrico y prostaglandinas en la regulación endotelial del tono contráctil en la vasculatura renal de ratas hipertensas. *Rev Sanid Mil Mex* 2005;59:32-50.
72. **Stevens A, Lowe J:** Human histology. 3ª ed. Inglaterra, Elsevier, 2005.
73. **Strasser A:** Apoptosis. Death of a T cell. *Nature* 1995;373: 365- 66.
74. **Stryer L, Berg JM, Tymoczko JL:** *Bioquímica.* 5ª ed. España, Reverté, 2003.
75. **Suda T, Takahashi T, Golstein P, Nagata S:** Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 1993;75:1169-1178.
76. **Suzanne C:** Fascinating death factor. *Nature* 1994;367:317-318.

www.elsolucionario.org

77. **Tanaka H, Shilbagaki I, Shimada Y, Wagata T, Immamura M *et al.:*** Characterization of p53 gene mutations in esophageal squamous cell carcinoma cell lines: increased frequency and different spectrum of mutations from primary tumors. *Int J Cancer* 1996;65:372-376.
78. **Tucek Scabo C, Andjelic S, Lacy E, Elkon KB, Nikolic Zingic J:** Surface T cell Fas receptors/CD95 regulation, *in vivo* activation and apoptosis. *J Immunol* 1996;156:192-200.
79. **Wheater PR *et al.:*** *Histología funcional.* 4ª ed. Churchill-Livingstone, 2000.
80. **Wyllie AH, Morris RG, Smith AL, Dunlop D:** Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J Pathol* 1984;142:67.
81. **Wyllie AH, Kerr JFR, Curri AR:** Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 1980;68:251.
82. **Yang E, Zha J, Jockel J:** Bad, a heterodimetric partner for Bcl-2XI and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. **Cell** 1995;80:285-291.

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

www.elsolucionario.org

Índice alfabético

A

aberración cromosómica, 109, 155
ácido
  desoxirribonucleico, 1, 26
  graso, 20
    insaturado, 20
  nucleico, 13, 15, 25
  ribonucleico, 1, 27
acidosis, 11
  metabólica, 12
  respiratoria, 12
  sistémica, 12
aclaramiento, 208
acromatopsia, 137
activación celular, 154
adaptación, 4
agente mutagénico, 132, 180
agua corporal, regulación del, 10
alcalosis, 11
  metabólica, 12
  respiratoria, 12
aldehído, 13
alelo, 119, 127
  de susceptibilidad, 180
  dominante, 127
  recesivo, 127
alfa-hélice, 17
alteración genética, 180, 181
anabólisis, 15
anabolismo, 5
anafase, 144
anemia
  de Fanconi, 182
  drepanocítica, 137
aneuploidía, 135
angiogénesis tumoral, 183
anión, 6
anomalía cromosómica, 134
anticuerpo, 15
aparato de Golgi, 77
apoptosis, 87, 139, 157, 160, 181
  deficiente, 177
apoptosoma, 173
arqueobacteria, 30
artritis reumatoide, 177
asimilación, 4
ataxia, 138
atrofia de la espina muscular, 177
autocatálisis, 168
autofagia, 81
autorradiografía, 232
autorreplicación, 1
azúcar, 52

B

bacteria, 1
bioelemento, 7
biología molecular del cáncer, 179
biomolécula, 14
biopolímero, 14
biopsia, 205
biosíntesis de proteínas, 64

C

cadena
  de transporte de electrones, 83
  respiratoria, 84, 86
cáncer, 179
  cervicouterino, 180
  de células germinales, 189
  de colon, 179, 185
  de escroto, 180
  de estómago, 179, 180
  de intestino grueso, 179
  de mama, 179, 180, 185
  de páncreas, 185
  de próstata, 179
  de pulmón, 179, 185
  de tiroides, 185
  del cuello uterino, 179
  familiar, 155
carbohidrato, 1, 13, 22, 52
carcinoma, 179
  basocelular de la piel, 185
  de colon, 189
cariocinesis, 139
carioplasma, 100
cariorrexis, 158
cariotipo, 106, 134
catabolismo, 5
catálisis, 15
catepsina, 81
catión, 6

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

célula(s), 1
  aislamiento de, 233
  ancestral universal, 116
  binucleada, 100
  cancerosa, 155, 179, 182
  eucariota, 1, 99, 100
  germinal diploide, 145
  maligna, 188
  plurinucleada, 100
  procariota, 1
  senescente, 155
  separación de, 233
centrifugación, 231
cérido, 21
cetona, 13
ciclina, 150
ciclo
  celular, 139
  de Krebs, 11, 85
  del ácido cítrico, 85
ciclosis, 3, 80
cigonema, 146
cinetocoro, 143
circulación, 4
citocinesis, 139, 141, 144, 148
citoesqueleto, 88
citoplasma, 1, 49
citosol, 1, 49
coagulación sanguínea, 8, 21
código genético, 27, 100, 119, 125
codón, 119
coenzima, 83
colágeno, 18
coloración
  combinada, 212
  directa, 212
  indirecta, 212
  métodos de, 212
  pancrómica, 212
  panóptica, 212
  progresiva, 212
  regresiva, 212
  simple, 212
  tricrómica, 215
colorante(s)
  ácidos, 213
  artificiales, 212
  básicos, 213
  naturales, 212
  sintéticos, 212
  tipos de, 212
compuesto orgánico, 13
condensación, 14
conductividad, 3
contractilidad, 3
corea de Huntington, 136
cosupresión, 115
crecimiento, 2
cromátide, 106
cromatina, 99, 100
cromosoma
  autosómico, 119
  diploide, 4
cuerpo multivesicular, 80
cultivo celular en placas de cultivo, 234

D

daltonismo, 137
degradación del RNA, 115
deleción clonal, 174
deshidratación, 10, 208
desnaturalización, 26
diacinesis, 147
diafanización, 208
dictiosoma, 77
dictioteno, 147
diferenciación celular, 101
digestión, 4
  enzimática, 157
  intercelular, 81
diplonema, 147
diploteno, 147
disacárido, 24
discromatismo, 137
displasia, 179
distrofia muscular de Duchenne, 137
diversidad genética, 148
división
  celular, 1, 38, 83, 88, 100
    vegetal, 79
  citoplasmática, 139
DNA, 26
dominio de muerte, 157

E

eicosanoide, 20
electrólito, 8
enantiómero, 15
endocitosis, 53, 55, 81
endonucleólisis, 157
endosoma, 56
enfermedad
  de Alzheimer, 93, 177
  de Creutzfeldt-Jakob, 40
  de Huntington, 136, 177
  de von Recklinghausen, 136
  genética, 121, 135
  poliquística del riñón, 136
  recesiva, 119
enlace
  covalente, 6
  de hidrógeno, 6
  doble, 6
  no polar, 6
  polar, 6
  químico, 6
  simple, 6
envoltura nuclear, 99
enzima, 1, 15
equilibrio
  ácido-base, 8, 11
  hídrico, 8, 10
esclerosis lateral amiotrófica, 177
espermatozoide, 3
esteroide, 19
estrés celular, 173
eubacteria, 30
eucariota, 1
eugenesia, 122
evolución, 1, 29
  molecular, 34, 125
examen citológico, 217
excreción, 4, 5
exocitosis, 53, 55
exón, 124
expresión genética, 100

F

factor de transcripción, 112
fagocitosis, 53, 55, 81
fenilcetonuria, 137
fenotipo, 101, 127
fermentación, 5
fibroína, 18
fibrosis quística, 136
fijación, 205
fijadores

www.elsolucionario.org

físicos, 206
químicos, 206
fisiología celular, 3
fisión binaria, 83, 141
fosfatasa, 81
fosfoglicérido, 22
fosfolipasa, 81
fosfolípido, 22
fosforilación, 64, 85
oxidativa, 83, 86
fotomicrografía, 196
fotosíntesis, 4, 43
fraccionamiento celular, 230
fuerzas de van der Waals, 7

G

gameto haploide, 145
gen, 100, 121, 125
dominante, 127
estructural, 126
mitocondrial, 131
recesivo, 127
redundante, 126
regulador, 126
supresor de tumores, 180, 181
transcripción de, 112
transmisión de, 127
genoma, 99, 100, 120
codificante, 121
humano, 119
nuclear, 129
mitocondrial, 86, 101, 131
nuclear, 101, 131
genotipo, 101, 127
gliceraldehído, 15
glicérido, 20
glicolípido, 25
glicosilación, 64
glúcido, 52
glucosidasa, 81

H

hemocatéresis, 96
hemofilia, 137
hemólisis fisiológica, 96
hemorragia, 10
herencia, 2, 4, 119
cuantitativa, 128
humana, 126
multifactorial, 128
poligénica, 128
hidrato de carbono, 22, 96
hidrocarburo, 13
hidrólisis, 14
hipercapnia, 12
hipercolesterolemia familiar, 136
hiperlipoproteinemia, 136
hiperplasia, 4
hipertrofia, 4
hipótesis quimiosmótica, 85
histona, 99
homeostasis, 6
tisular, 162
homeotermia, 6
hormona, 15
huella génica, 124

I

inclusión, 208
inestabilidad genómica, 155, 183, 185
infección
celular, 170
viral crónica, 177
infiltración, 208
información genética, 2, 15, 99, 100
ingestión, 4
inmersión, 207
inmunoelectromicroscopia, 229
insuficiencia vascular, 177
intercinesis, 148
interfase, 139
intrón, 115, 124
ion, 6
irritabilidad, 3
isómero, 15
geométrico, 15
óptico, 15
isótopo, 8
isquemia, 177
cerebral, 177

L

lente
objetivo, 194
ocular, 194
leptonema, 146
leptoteno, 146
leucemia, 155, 185
linfoblástica aguda, 189
mieloide
aguda, 185, 190
crónica, 190
leyes de Mendel, 128
linfoma, 155
lipasa, 81
lípido, 1, 13, 15, 19, 50, 96
líquido
cefalorraquídeo, 10
extracelular, 10
intersticial, 10
intracelular, 10
intraocular, 10
intravascular, 10
peritoneal, 10
plasmático, 10
pleural, 10
sinovial, 10
transcelular, 10
lisosoma, 80
lupus eritematoso sistémico, 177

M

macromolécula, 14
mapeo génico, 126
marcador genético, 100
meiosis, 4, 110, 145, 148
melanoma, 180, 185
membrana
celular, 49
nuclear, 1
metabolismo, 1, 2, 4
basal, 5
celular, 87
metacromasia, 213
metafase, 144
metástasis, 179
macroscópica, 187
metazoo, 1
metilación, 124
microanalizador de sonda de electrones, 200
microscopio, 193
compuesto, 193, 195, 196
confocal, 201
de campo

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

cercano, 198
claro, 194
de contraste
de fases, 194, 197
interferencial diferencial, 197
de efecto túnel, 200
de fluorescencia, 194, 198
de fuerza atómica, 200
de interferencia, 194, 197
de luz, 194
polarizada, 197
ultravioleta, 197
de polarización, 197
de sonda de barrido, 200
electrónico, 194, 198
de alta aceleración, 200
de barrido, 199, 200
y transmisión, 200
de transmisión, 199
en campo oscuro, 197
estereoscópico, 196
óptico, 195, 196
petrográfico, 197
tipos de, 196
microtomía, 209
mineralización ósea, 8
mitocondria, 82
mitosis, 4, 110, 139, 141, 142
molécula(s), 6
de secreción
autocrina, 58
citocrina, 58
paracrina, 58
yuxtacrina, 58
de señalización endocrina, 58
hidrofílica, 57
inorgánica, 6
lipofílica, 58
con receptores de superficie, 58
no polar, 6
orgánica, 6, 13
polar, 6
monocromatismo, 137
monómero, 14
monosacárido, 23
monosomía, 135
movimiento ameboidal, 4
mucoviscidosis, 136
muerte
celular, 149, 157, 181
fisiológica, 158
patológica, 158
programada, 87, 157, 162
por necrosis, 157
mutación, 125, 132
cromosómica espontánea, 132
gamética, 133
somática, 185
mutagénesis insercional, 185

N

nacimiento celular, 139
necropsia, 205
necrosis, 160
celular, 158
neoplasia, 179
neuroblastoma, 185
neurofibromatosis generalizada, 136
neurona, 2
cortical, 100
neuropatía, 138
hereditaria de Leber, 138
nódulo de recombinación, 147
nucleasa, 81
núcleo celular, 99
nucleolema, 1, 99, 101
nucleoplasma, 1, 100
número diploide, 139
nutrición, 4

O

oncogén
celular, 179
viral, 179, 180
operón, 126
organelo, 1, 49
celular, 1
organismo
microscópico, 1
unicelular, 1
ósmosis, 54
osteosarcoma, 185
oxidación, 5

P

paquinema, 147
paquiteno, 147
perfusión, 207
intracardiaca, 207
intratraqueal, 207
peroxisoma, 81
pigmento, 96
endógeno, 96
exógeno, 96
pinocitosis, 53, 55, 81
plasmalema, 1, 49
plásmido, 37
plegamiento, 64
poder de resolución, 193
polímero biológico, 14
polimorfismo, 119
de un nucleótido, 131
poliploidía, 135
polisacárido, 15, 24
potencial tumorigénico, 183
potocitosis, 53, 55, 56
procariota, 1
proliferación celular, 155, 157
proteasa, 81
proteasoma, 81
proteína(s), 1, 13, 15, 52
biosíntesis de, 64
globular, 17
síntesis de, 74
protoplasma, 1
protozoo, 1
Proyecto
Genoma Humano, 121
Hap-Map, 121
puentes de hidrógeno, 6

Q

quimiosíntesis, 4

R

radioisótopos, 232
raquitismo hipofosfatémico, 137
receptores de muerte, 163
recombinación genética, 147
reconocimiento celular, 57
redistribución cromosómica, 185
regulación génica, 128
reino
Animalia, 35, 40, 43
Fungi, 35, 40, 41

www.elsolucionario.org

Monera, 35, 40, 41
Plantae, 35, 40, 43
Protista, 35, 40
renaturalización, 26
reparación del DNA, 133
replicación, 100
conservadora, 111
del DNA, 110
dispersora, 111
procariota, 110
semiconservadora, 111
viral, 38
replicón, 111
replisoma, 111
reproducción, 2
asexual, 4
celular, 4
sexual, 4, 148
respiración, 4, 5
celular, 3, 5, 85
respuesta inflamatoria, 158
retinitis pigmentaria, 138
retinoblastoma, 180, 183
retraso mental, 137
retroposón, 121
retrotranscripción, 117
retrovirus, 117
ribonucleoproteína, 101
ribosoma, 1
ribozima, 116
RNA, 27

S

sarcoma, 179, 185
secuencia
Cambridge, 86
codificadora del gen, 104
de localización nuclear, 101
selección
natural, 29
negativa, 174
senescencia celular, 155
señal
de exportación nuclear, 101
de localización nuclear, 101
de muerte, 158
seudogén, 125
SIDA, 38, 177
sinapsis, 9, 146
síndrome
de Down, 109, 138
de Li Fraumeni, 183
síntesis
de proteínas, 74
proteica, 27
sobrehidratación, 10
soma neuronal, 100
spliceosoma, 116
suicidio celular, 157
sulfatación, 64

T

tándem de genes, 104
taupatía, 92
taxismo, 3, 4
técnica histológica, 205
telofase, 101, 144
teoría celular, 34
terpeno, 21
tiempo de regeneración, 139
tinción, 211
fundamentos químicos, 213
métodos de, 194
traducción, 74
génica, 121
transcitosis, 53, 55, 56
transcripción, 25, 121
de genes, 112
factores de, 112
transducción de señales, 154
translocación, 135
proteica, 65
recíproca, 135
simple, 135
translocón, 65
transmisión de genes, 127
transposición, 121
transposón, 121
trastorno
cromosómico, 138
del equilibrio ácido-base, 12
hereditario dominante, 119
mendeliano, 119
multifactorial, 138
triacilglicerol, 21
tricrómica
de Cajal, 215
de Gallego, 215
de Gomori, 215
de Mallory, 215
de Masson, 215
triglicérido, 21
trisomía, 135
tropismo, 3
tumor de piel, 180
tumorigénesis, 181, 183

U

ubicuitinización, 82
unión
electrostática, 6
iónica, 6

V

vacuola, 80
VIH, 38
virus, 1, 38
de la inmunodeficiencia humana, 38
del papiloma humano, 184
vitamina
A, 21
E, 21
K, 21

X

xantomatosis hipercolesterolémica, 136

Z

zigoteno, 146

© Editorial Alfil. Fotocopiar sin autorización es un delito.

www.elsolucionario.org

www.elsolucionario.org

www.elsolucionario.org

www.elsolucionario.org

Dolores Javier Sánchez González
Profesor e Investigador de la Escuela Médico Militar y Jefe del Departamento de Biología Celular y Tisular, Universidad del Ejército y Fuerza Aérea

Nayeli Isabel Trejo Bahena
Sección de Medicina Legal del Hospital Central Militar y la Escuela Militar de Graduados de Sanidad, Universidad del Ejército y Fuerza Aérea

En esta obra se presenta una amplia información desde el panorama evolutivo de los seres vivos hasta su composición celular y molecular fundamental. Es un texto didáctico que incluye fotografías y esquemas de la estructura y composición molecular de las células. Incluye una sección especial de microscopia y una novedosa sección de técnicas básicas en biología celular y molecular, así como de la técnica histológica, para ayudar al lector a comprender el proceso que va desde la toma de la muestra biológica de células y tejidos, pasando por su procesamiento, hasta llegar a la observación al microscopio.

ISBN 968-7620-34-X
9 789687 620343

www.elsolucionario.org